

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-512597

(P2018-512597A)

(43) 公表日 平成30年5月17日(2018.5.17)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
<b>G01N 33/50</b> (2006.01)	G01N 33/50	Z 2 G045
<b>C12N 15/09</b> (2006.01)	C12N 15/00	Z NAA 4 B063
<b>C07K 14/705</b> (2006.01)	C07K 14/705	4 B065
<b>C07K 16/30</b> (2006.01)	C07K 16/30	4 C084
<b>C07K 16/46</b> (2006.01)	C07K 16/46	4 HO45

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 179 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-559776 (P2017-559776)	(71) 出願人	509012625 ジエンテック, インコーポレイテッド
(86) (22) 出願日	平成28年2月4日 (2016.2.4)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ ディーエヌエーウェイ 1
(85) 翻訳文提出日	平成29年10月2日 (2017.10.2)	(71) 出願人	501188889 キュリス, インコーポレイテッド
(86) 國際出願番号	PCT/US2016/016614		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02421 レキントン, マグアイア ロード 4
(87) 國際公開番号	W02016/126972	(71) 出願人	517274383 アシスタンス パブリーカーオピトー ド パリ
(87) 國際公開日	平成28年8月11日 (2016.8.11)		フランス共和国 75004 パリ アヴニュ ヴィクトリア 3
(31) 優先権主張番号	62/112,074		
(32) 優先日	平成27年2月4日 (2015.2.4)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】突然変異体スマースンド及びその使用方法

## (57) 【要約】

癌患者を分子標的療法で治療した後のチロシンキナーゼ中の突然変異の出現は、薬物耐性獲得の主要な機構を表す。ここでは、髄芽細胞腫などにおけるヘッジホッグ (Hh) 経路阻害剤に対する耐性をもたらすセルペンチン受容体スマースンド (SMO) の突然変異を記載する。SMOの保存された残基中のアミノ酸置換は、Hhシグナル伝達を維持するが、Hh経路阻害剤GDC-0449がSMOと結合してこの経路を抑制することを不能にする。いくつかの実施形態では、本開示は、新規の突然変異体SMOタンパク質及び核酸、ならびにSMO突然変異を検出するためのスクリーニング方法、及び薬物耐性を呈する突然変異体SMOを特異的に調節する薬物をスクリーニングするための方法を提供する。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

アミノ酸 241 で突然変異を組み込む突然変異体 SMO タンパク質のシグナル伝達を阻害する化合物についてスクリーニングする方法であって、前記突然変異体 SMO を試験化合物と接触させること、及び前記化合物と前記突然変異体 SMO との結合を検出することを含み、前記試験化合物と突然変異体 SMO との結合により、前記試験化合物が突然変異体 SMO の阻害剤であることが示される、方法。

**【請求項 2】**

アミノ酸 241 で突然変異を組み込む突然変異体 SMO タンパク質のシグナル伝達を阻害する化合物についてスクリーニングする方法であって、前記突然変異体 SMO を発現する細胞を試験化合物と接触させること、及び前記細胞内の G1i の活性を検出することを含み、G1i 活性の存在により、前記試験化合物が突然変異体 SMO の阻害剤でないことが示される、方法。

**【請求項 3】**

アミノ酸 469 で突然変異を組み込む突然変異体 SMO タンパク質のシグナル伝達を阻害する化合物についてスクリーニングする方法であって、前記突然変異体 SMO を試験化合物と接触させること、及び前記化合物と前記突然変異体 SMO との結合を検出することを含み、前記試験化合物と突然変異体 SMO との結合により、前記試験化合物が突然変異体 SMO の阻害剤であることが示される、方法。

**【請求項 4】**

アミノ酸 469 で突然変異を組み込む突然変異体 SMO タンパク質のシグナル伝達を阻害する化合物についてスクリーニングする方法であって、前記突然変異体 SMO を発現する細胞を試験化合物と接触させること、及び前記細胞内の G1i の活性を検出することを含み、G1i 活性の存在により、前記試験化合物が突然変異体 SMO の阻害剤でないことが示される、方法。

**【請求項 5】**

配列番号 6 に少なくとも 95% 同一であるアミノ酸配列を含み、前記アミノ酸配列が、アミノ酸 241 でトレオニン以外のアミノ酸を含む、単離された突然変異体 SMO タンパク質。

**【請求項 6】**

前記配列番号 6 のアミノ酸を含み、前記アミノ酸配列が、アミノ酸 241 でトレオニン以外のアミノ酸を含む、請求項 5 に記載の単離された突然変異体 SMO タンパク質。

**【請求項 7】**

前記アミノ酸配列が、アミノ酸 241 でメチオニン (M) を含む、請求項 5 または 6 に記載の単離された突然変異体 SMO タンパク質。

**【請求項 8】**

配列番号 8 と少なくとも 95% 同一であるアミノ酸配列を含み、前記アミノ酸配列が、アミノ酸 469 でシステイン (C) 以外のアミノ酸を含む、単離された突然変異体 SMO タンパク質。

**【請求項 9】**

前記配列番号 8 のアミノ酸配列を含み、前記アミノ酸配列が、アミノ酸 469 でシステイン (C) 以外のアミノ酸を含む、請求項 8 に記載の単離された突然変異体 SMO タンパク質。

**【請求項 10】**

前記アミノ酸配列が、アミノ酸 469 でチロシン (Y) を含む、請求項 8 または 9 に記載の単離された突然変異体 SMO タンパク質。

**【請求項 11】**

ヘッジホッグ経路阻害剤阻害剤を同定する方法であって、細胞をある量の試験薬剤と接触させることであって、前記細胞が、ヘッジホッグタンパク質に応答するか、または増加したヘッジホッグシグナル伝達及び/もしくは前記ヘッジホッグシグナル伝達経路の活性

10

20

30

40

50

化を有し、前記細胞が、請求項 5 ~ 10 のいずれかに記載の突然変異体 SMO タンパク質を発現する、接触させることと、b) 前記試験薬剤が前記細胞においてヘッジホッグシグナル伝達を阻害するかどうかを対照と比較して決定することであって、前記試験薬剤が前記対照と比べて前記細胞においてヘッジホッグシグナル伝達を阻害する場合には、前記試験薬剤がヘッジホッグ経路阻害剤として同定される、決定することと、を含む、方法。

【請求項 12】

前記細胞においてヘッジホッグシグナル伝達を阻害する前記試験薬剤の能力が、G1i 1 発現アッセイを使用して決定される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

ヘッジホッグ経路阻害剤を同定する方法であって、細胞をある量の試験薬剤と接触させることであって、前記細胞が、ヘッジホッグタンパク質に応答するか、または増加したヘッジホッグシグナル伝達及び／もしくは前記ヘッジホッグシグナル伝達経路の活性化を有し、前記細胞が、5 ~ 10 のいずれかに記載の突然変異体 SMO タンパク質を発現する、接触させることと、b) 前記試験薬剤が前記細胞の成長及び／または増殖を阻害するかどうかを対照と比較して決定することであって、前記試験薬剤が前記対照と比べて前記細胞の成長及び／または増殖を阻害する場合には、前記試験薬剤がヘッジホッグ経路阻害剤として同定される、決定することと、を含む、方法。

10

【請求項 14】

前記対照が、野生型 SMO タンパク質を発現している細胞である、請求項 11 ~ 13 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 15】

前記対照が、前記試験薬剤と接触させた前記細胞と同じ突然変異体 SMO タンパク質を発現している細胞であり、前記対照が、前記突然変異体 SMO タンパク質が部分的または完全に耐性である対照薬剤で処理される、請求項 11 ~ 13 のいずれかに記載の方法。

【請求項 16】

前記対照薬剤が、ビスマデギブ、LY2940680、LDE225、及び／または化合物 5 である、請求項 15 に記載の方法。

30

【請求項 17】

前記試験薬剤が、突然変異体 SMO タンパク質と結合するが、野生型 SMO タンパク質とは結合しない、請求項 11 ~ 16 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 18】

前記試験薬剤が、突然変異体 SMO タンパク質及び野生型 SMO タンパク質の両方と結合する、請求項 11 ~ 16 のいずれかに記載の方法。

【請求項 19】

前記試験薬剤が、突然変異体 SMO タンパク質を発現している細胞における前記ヘッジホッグシグナル伝達経路の阻害において野生型 SMO タンパク質を発現している細胞よりも有効である、請求項 11 または 12 に記載の方法。

40

【請求項 20】

前記試験薬剤が、突然変異体 SMO タンパク質を発現している細胞の成長及び／または増殖の阻害において野生型 SMO タンパク質を発現している細胞よりも有効である、請求項 13 に記載の方法。

40

【請求項 21】

配列番号 1 に少なくとも 95 % 同一であるアミノ酸配列を含み、前記アミノ酸配列が、アミノ酸 241 でトレオニン以外のアミノ酸を含む、突然変異体 SMO タンパク質をコードする単離された核酸分子。

40

【請求項 22】

前記突然変異体 SMO タンパク質が、配列番号 6 のアミノ酸配列を含み、前記アミノ酸配列が、アミノ酸 241 でメチオニン (M) を含む、請求項 21 に記載の単離された核酸分子。

40

【請求項 23】

50

配列番号 5 の親核酸配列を含み、前記配列が、アミノ酸 2 4 1 をコードする配列を、異なるアミノ酸をコードするように変化させる突然変異を含む、請求項 2 1 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 2 4】

配列番号 1 に少なくとも 9 5 % 同一であるアミノ酸配列を含み、前記アミノ酸配列が、アミノ酸 4 6 9 でシスティン (C) 以外のアミノ酸を含む、突然変異体 S M O タンパク質をコードする単離された核酸分子。

【請求項 2 5】

前記突然変異体 S M O タンパク質が、配列番号 8 のアミノ酸配列を含み、前記アミノ酸配列が、アミノ酸 4 6 9 でチロシン (Y) を含む、請求項 2 4 に記載の単離された核酸分子。

10

【請求項 2 6】

配列番号 5 の親核酸配列を含み、前記配列が、アミノ酸 4 6 9 をコードする配列を、異なるアミノ酸をコードするように変化させる突然変異を含む、請求項 2 4 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 2 7】

請求項 2 1 ~ 2 3 または 2 4 ~ 2 6 のいずれかに記載の核酸を含むベクター。

【請求項 2 8】

請求項 2 7 のベクターを含む宿主細胞。

20

【請求項 2 9】

請求項 2 7 に記載のベクターを含み、かつそれを発現することができる、宿主細胞。

【請求項 3 0】

ヘッジホッグ経路阻害剤阻害剤を同定する方法であって、細胞をある量の試験薬剤と接触させることであって、前記細胞が、ヘッジホッグタンパク質に応答するか、または増加したヘッジホッグシグナル伝達及び／もしくは前記ヘッジホッグシグナル伝達経路の活性化を有し、前記細胞が、請求項 2 7 に記載のベクターを発現する、接触させることと、b ) 前記試験薬剤が前記細胞においてヘッジホッグシグナル伝達を阻害するかどうかを対照と比較して決定することであって、前記試験薬剤が前記対照と比べて前記細胞においてヘッジホッグシグナル伝達を阻害する場合には、前記試験薬剤がヘッジホッグ経路阻害剤として同定される、決定することと、を含む、方法。

30

【請求項 3 1】

前記細胞においてヘッジホッグシグナル伝達を阻害する前記試験薬剤の能力が、G 1 i 1 発現アッセイを使用して決定される、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

ヘッジホッグ経路阻害剤を同定する方法であって、細胞をある量の試験薬剤と接触させることであって、前記細胞が、ヘッジホッグタンパク質に応答するか、または増加したヘッジホッグシグナル伝達及び／もしくは前記ヘッジホッグシグナル伝達経路の活性化を有し、前記細胞が、請求項 2 7 に記載のベクターを発現する、接触させることと、b ) 前記試験薬剤が前記細胞の成長及び／または増殖を阻害するかどうかを対照と比較して決定することであって、前記試験薬剤が前記対照と比べて前記細胞の成長及び／または増殖を阻害する場合には、前記試験薬剤がヘッジホッグ経路阻害剤として同定される、決定することと、を含む、方法。

40

【請求項 3 3】

試料中の突然変異体 S M O 遺伝子を検出する方法であって、前記試料から、突然変異を含むことが疑われる S M O の第 1 の細胞外ループのカルボキシ末端またはその断片に対応する核酸を増幅することと、前記増幅された核酸の電気泳動移動度を、対応する野生型 S M O 遺伝子またはその断片の電気泳動移動度と比較することと、を含む、方法。

【請求項 3 4】

前記電気泳動移動度がポリアクリルアミドゲル上で決定される、請求項 3 3 に記載の方法。

50

**【請求項 3 5】**

試料中の突然変異 S M O 遺伝子を検出する方法であって、前記試料から、突然変異を含むことが疑われる S M O の膜貫通ドメイン 6 のカルボキシ末端またはその断片に対応する核酸を増幅することと、前記増幅された核酸の電気泳動移動度を、対応する野生型 S M O 遺伝子またはその断片の電気泳動移動度と比較することと、を含む、方法。

**【請求項 3 6】**

前記電気泳動移動度がポリアクリルアミドゲル上で決定される、請求項 3 5 に記載の方法。

**【請求項 3 7】**

試料中の少なくとも 1 つの S M O 突然変異を同定する方法であって、前記試料由来の核酸を、アミノ酸 2 4 1 をコードする配列をトレオニン以外のアミノ酸に変化させる突然変異を組み込んでいる突然変異 S M O タンパク質またはその断片をコードする核酸に特異的にハイブリダイズすることができる核酸プローブと接触させることと、前記ハイブリダイゼーションを検出することと、を含む、方法。

10

**【請求項 3 8】**

前記プローブが検出可能に標識されている、請求項 3 7 に記載の方法。

**【請求項 3 9】**

前記プローブがアンチセンスオリゴマーである、請求項 3 7 または 3 8 に記載の方法。

**【請求項 4 0】**

前記核酸前記試料中の前記 S M O 遺伝子またはその断片を増幅し、前記プローブと接触させる、請求項 3 7 ~ 3 9 のいずれかに記載の方法。

20

**【請求項 4 1】**

試料中の少なくとも 1 つの S M O 突然変異を同定する方法であって、前記試料由来の核酸を、アミノ酸 4 6 9 をコードする配列をシステイン以外のアミノ酸に変化させる突然変異を組み込んでいる突然変異 S M O タンパク質またはその断片をコードする核酸に特異的にハイブリダイズすることができる核酸プローブと接触させることと、前記ハイブリダイゼーションを検出することと、を含む、方法。

**【請求項 4 2】**

前記プローブが検出可能に標識されている、請求項 4 1 に記載の方法。

**【請求項 4 3】**

30

前記プローブがアンチセンスオリゴマーである、請求項 4 0 または 4 1 に記載の方法。

**【請求項 4 4】**

前記核酸前記試料中の前記 S M O 遺伝子またはその断片を増幅し、前記プローブと接触させる、請求項 4 0 ~ 4 3 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 4 5】**

G D C - 0 4 4 9 による治療に耐性であるヒト対象において腫瘍を同定する方法であって、前記腫瘍の試料中の突然変異 S M O 遺伝子または突然変異 S M O タンパク質の存在を決定することを含み、前記突然変異 S M O 遺伝子が、アミノ酸 2 4 1 で突然変異を含む S M O タンパク質をコードし、前記 S M O タンパク質が、アミノ酸 2 4 1 で突然変異を含み、前記突然変異 S M O 遺伝子または突然変異 S M O タンパク質の存在により、前記腫瘍が G D C - 0 4 4 9 による治療に対して耐性であることが示される、方法。

40

**【請求項 4 6】**

G D C - 0 4 4 9 による治療に対して感受性がないか、もはや感受性がない腫瘍を有する前記対象を、前記突然変異 S M O に結合する化合物で治療することをさらに含む、請求項 4 5 に記載の方法。

**【請求項 4 7】**

前記突然変異の存在または不在を核酸試料の検査によって決定する、請求項 4 5 または 4 6 に記載の方法。

**【請求項 4 8】**

前記突然変異の存在または不在をタンパク質試料の検査によって決定する、請求項 4 5

50

~ 4 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 9】

G D C - 0 4 4 9 による治療に耐性であるヒト対象において腫瘍を同定する方法であつて、前記腫瘍の試料中の突然変異 S M O 遺伝子または突然変異 S M O タンパク質の存在を決定することを含み、前記突然変異 S M O 遺伝子が、アミノ酸 4 6 9 での突然変異を含む S M O タンパク質をコードし、前記 S M O タンパク質が、アミノ酸 4 6 9 での突然変異を含み、前記突然変異 S M O 遺伝子または突然変異 S M O タンパク質の存在により、前記腫瘍が G D C - 0 4 4 9 による治療に対して耐性であることが示される、方法。

【請求項 5 0】

G D C - 0 4 4 9 による治療に対して感受性がないか、もはや感受性がない腫瘍を有する前記対象を、前記突然変異 S M O に結合する化合物で治療することをさらに含む、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記突然変異の存在または不在を核酸試料の検査によって決定する、請求項 4 9 または 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記突然変異の存在または不在をタンパク質試料の検査によって決定する、請求項 4 9 ~ 5 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 3】

異常なヘッジホッギナル伝達を有する細胞の増殖または成長を阻害する方法であつて、前記細胞にプロモドメイン阻害剤を投与することを含み、前記細胞が、配列番号 1 のアミノ酸位置 2 4 1 または 4 6 9 に対応するアミノ酸位置のうちのいずれか 1 つ以上で突然変異を有するスムースンドタンパク質を発現する、方法。

【請求項 5 4】

前記細胞が対象中にある、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記細胞が癌細胞である、請求項 5 3 または 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記細胞が S U F U 突然変異をさらに含む、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記細胞がヒト細胞であり、前記細胞が、前記 S U F U 遺伝子のコピーの喪失をもたらす 1 0 q 欠失突然変異を含む、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記 1 0 q 欠失が、さらに前記 P T E N 遺伝子のコピーの損失をもたらす、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記プロモドメイン阻害剤が、I - B E T 7 6 2 、 J Q 1 、または J Q 2 である、請求項 5 3 ~ 5 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6 0】

アミノ酸 2 4 1 をコードする配列中に突然変異を組み込んでいる突然変異 S M O タンパク質またはその断片をコードする核酸に特異的にハイブリダイズすることができる、核酸プローブ。

【請求項 6 1】

前記プローブが、前記突然変異 S M O または前記その断片をコードする前記核酸に相補的である、請求項 6 0 に記載のプローブ。

【請求項 6 2】

約 1 0 ~ 約 5 0 ヌクレオチドの長さを有する、請求項 6 0 に記載のプローブ。

【請求項 6 3】

検出可能な標識をさらに含む、請求項 6 0 に記載のプローブ。

【請求項 6 4】

10

20

30

40

50

アミノ酸 469 をコードする配列中に突然変異を組み込んでいる突然変異 SMO タンパク質またはその断片をコードする核酸に特異的にハイブリダイズすることができる、核酸プローブ。

【請求項 6 5】

前記プローブが、前記突然変異 SMO または前記その断片をコードする前記核酸に相補的である、請求項 6 4 に記載のプローブ。

【請求項 6 6】

約 10 ~ 約 50 ヌクレオチドの長さを有する、請求項 6 4 に記載のプローブ。

【請求項 6 7】

検出可能な標識をさらに含む、請求項 6 4 に記載のプローブ。

10

【請求項 6 8】

請求項 5 ~ 7 のいずれかに記載の突然変異体 SMO タンパク質に特異的に結合する抗体であって、前記抗体が、アミノ酸 241 でトレオニンを有する野生型 SMO に結合しない、抗体。

【請求項 6 9】

前記抗体が、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、单鎖抗体、またはこれらの抗原結合断片である、請求項 6 8 に記載の抗体。

【請求項 7 0】

前記抗体が、細胞毒性剤にコンジュゲートされている、請求項 6 8 または 6 9 に記載の抗体。

20

【請求項 7 1】

前記抗体が、検出可能な標識にコンジュゲートされている、請求項 6 8 または 6 9 に記載の抗体。

【請求項 7 2】

前記抗体が、SMO 活性を阻害する、請求項 6 8 ~ 7 1 のいずれかに記載の抗体。

【請求項 7 3】

請求項 8 ~ 10 のいずれかに記載の突然変異体 SMO タンパク質に特異的に結合する抗体であって、前記抗体のエピトープが、アミノ酸 469 でシスティンを有する野生型 SMO に結合しない、抗体。

30

【請求項 7 4】

前記抗体が、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、单鎖抗体、またはこれらの抗原結合断片である、請求項 7 3 に記載の抗体。

【請求項 7 5】

前記抗体が、細胞毒性剤にコンジュゲートされている、請求項 7 3 または 7 4 に記載の抗体。

【請求項 7 6】

前記抗体が、検出可能な標識にコンジュゲートされている、請求項 7 3 または 7 4 に記載の抗体。

【請求項 7 7】

前記抗体が、SMO 活性を阻害する、請求項 7 3 ~ 7 6 のいずれかに記載の抗体。

40

【発明の詳細な説明】

【関連出願】

【0001】

本出願は、2015年2月4日出願の米国仮出願第 62/112,074 号の優先権の恩典を主張する。前述の出願の開示は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

分子標的癌治療薬は、臨床において優れた活性を示している。最も著名な例の一部には、フィラデルフィア染色体陽性慢性骨髓性白血病 (CML) または KIT / PDGF R 突然変異胃腸管系間質腫瘍 (GIST) におけるチロシンキナーゼ阻害剤イマチニブ及び E

50

GFR突然変異非小細胞肺癌(NSCLC)におけるエルロチニブが含まれる(Krause, D. S. 及びVan Etten(2005) *N. Engl. J. Med.* 353(2): 172-187)。これらの薬剤を用いた治療は、これらの分子異常を有する患者集団において劇的な抗腫瘍応答をもたらしている。しかしながら、優れた初期の臨床応答にもかかわらず、ほとんどの患者は、薬物耐性の獲得が原因で最終的には進行する(Engelman, J. A. 及びJ. Settleman(2008) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 18(1): 73-79)。結果的に、耐性の機構の同定は、耐性の出現を潜在的に克服または回避することができる、より合理的な薬物の組み合せ及び「第2世代」阻害剤の開発への扉を開いた。

## 【0003】

10

髓芽細胞腫は、子供において最も一般的な脳の悪性腫瘍を表す、小脳の原始的な神経外胚葉性腫瘍である(Polkingshorne, W. R. 及びN. J. Tarbell(2007) *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 4(5): 295-304)。髓芽細胞腫に対する治療の1つの形態は、補助放射線療法である。生存率の改善にもかかわらず、補助放射線は消耗性の副作用と関連付けられ、したがって、新しい分子標的療法の必要性を支持している。

## 【0004】

20

ヘッジホッグ(Hh)シグナル伝達経路は、髓芽細胞腫の病因に直接関係があるとされている。ほとんどの場合、阻害性受容体PTCH1の機能喪失型突然変異に起因する、構成的Hhシグナル伝達は、弧発例のおよそ30%で示されている(Zurawel, R. H. et al. (2000) *Genes Chromosomes Cancer* 27(1): 44-51、Kool, M. et al. (2008) *PLoS ONE* 3(8): e3088、Dellovade, T. et al. (2006) *Annu. Rev. Neurosci.* 29: 539、Rubin, L. L. and F. J. de Sauvage(2006) *Nat. Rev. Drug Discov.* 5: 1026)。Ptch1についてヘテロ接合性のマウス(Ptch1<sup>+/−</sup>)は、髓芽細胞腫を自然発生することがあり、Hh経路阻害剤による治療は、腫瘍の消失及び延命をもたらす(Goodrich, L. V. et al. (1997) *Science* 277(5329): 1109-1113、Romer, J. T. et al. (2004) *Cancer Cell* 6(3): 229-240)。しかしながら、新規のHh経路阻害剤GDC-0449で治療された患者は、最初は治療に対する劇的な応答を示したが(Charles M. Rudin et al. (2009) *N. Engl. J. Med.* (提出済み))、結局は、治療に対する持続性のある応答を有することができず、腫瘍が再発することが最近観察された。

30

## 【0005】

40

BCCは、最も一般的なヒト癌であり、主にHh経路の過剰活性化によって引き起こされる(Oroら、1997; Xieら、1998)。Hhシグナル伝達経路と癌との間の関連性は、髓芽細胞腫(MB)及びBCCに高度に感受性があるゴーリンまたは基底細胞母斑症候群(BCNS)を患う患者において最初に発見された。これらの患者は、通常、Hhリガンドの受容体をコードするPatched 1(PTCH1)におけるヘテロ接合生殖系列突然変異を保有する(Hahnら、1996; Johnsonら、1996)。Hhリガンド結合は、セルペンチン膜貫通(TM)シグナル伝達物質スムースンド(SMO)のPTCH1抑制を軽減する。弧発性BCCの大多数は、PTCH1における不活性化突然変異及びヘテロ接合性の喪失(LOH)によって引き起こされ、残りの大部分は、SMOにおける活性化突然変異を有する(Reiffenbergerら、2005)。SMOは、融合(SUFU)及びタンパク質キナーゼA(PKA)のサプレッサーの阻害によってGLI転写因子の活性化及び核局在化を促進する。SUFUは、細胞質におけるGLI転写因子の結合及び隔離によってHh経路を負に調節する(Stoneら、1999)。SUFUにおける機能喪失突然変異も、ゴーリン症候群と関連付けられる(Pastorinoら、2009; Smithら、2014; Taylorら、2002)。弧

50

発性BCCのおよそ50%がTP53突然変異も有する(Jayaraman et al., 2014)。

【0006】

いくつかのHh経路阻害剤(HPI)が、BCC及びMBの両方について現在臨床研究中である(Amaki et al., 2013)。以前はGDC-0449として知られていたビスモデギブは、転移性及び局所進行性BCCの治療のために認可されているSMO阻害剤である(Sekulic et al., 2012)。ビスモデギブで治療されたBCC患者の大部分は、完全奏効及び部分奏効の両方を含む臨床的利益を経験する(Sekulic et al., 2012)。

【0007】

しかしながら、概算見積は、進行性BCC患者の最大20%が治療後最初の1年以内にビスモデギブへの耐性を生じることを示す(Chang and Oro, 2012)。これまで、臨床におけるビスモデギブへの後天的耐性の機能的にのみ特徴付けられた機構は、転移性MBを患う患者に由来した。SMO-D473H突然変異が再発性転移性腫瘍からの生検において検出され、インビトロの薬物結合を無効にすることが示された(Yau et al., 2009)。4つの他の臨床SMO突然変異がビスモデギブ耐性BCCにおいて最近報告されたが、機能的には検査されなかった(Brinkhuizen et al., 2014; Pricl et al., 2014)。さらなるSMO突然変異、GLI2などの下流Hh経路成分の増幅、ならびにホスファチジルイノシトール3-キナーゼ(PI3K)キナーゼ及び非定型タンパク質キナーゼC / (aPKC- / )を含むバイパスシグナル経路の活性化を含む、SMO阻害剤へのいくつかの耐性機構が臨床前モデルから明らかとなっている(Atwood et al., 2013; Buonamici et al., 2010; Dijkgraaf et al., 2011)。しかしながら、どの機構が患者において耐性を引き起こすのかは依然として不明である。

【0008】

GDC-0449で治療したときの薬物耐性を克服するために、さらなるGDC-0449耐性突然変異体SMOタンパク質を同定し、そのような突然変異体SMOタンパク質のSMO活性を調節する化合物を見出すことが、当技術分野において緊急に必要である。さらに、そのSMO遺伝子型の自然な変動または突然変異及び耐性の獲得のいずれかによって治療に対して耐性であり得る患者を診断する方法が必要である。

【発明の概要】

【0009】

本開示は、ある特定の実施形態において、腫瘍の化学療法耐性に関連するものなどの単離された突然変異体SMO核酸及びタンパク質、ならびにSMO突然変異体に結合するか、またはSMO活性を調節する化合物についてスクリーニングする方法に関し、また、癌の診断及び治療、特に、診断的及び/または予後判定的である突然変異の検出、ならびに薬物耐性腫瘍の治療にも関する。

【0010】

いくつかの実施形態では、本開示は、アミノ酸241で突然変異を組み込んでいる突然変異体SMOタンパク質のシグナル伝達を阻害する化合物についてスクリーニングする方法であって、該突然変異体SMOを試験化合物と接触させること、及び該化合物と該突然変異体SMOとの結合を検出することを含み、該試験化合物と該突然変異体SMOとの結合により、該試験化合物が突然変異体SMOの阻害剤であることが示される、方法を提供する。

【0011】

いくつかの実施形態では、本開示は、アミノ酸241で突然変異を組み込む突然変異体SMOタンパク質のシグナル伝達を阻害する化合物についてスクリーニングする方法であって、該突然変異体SMOを発現する細胞を試験化合物と接触させること、及び該細胞内のG1iの活性を検出することを含み、G1i活性の存在により、該試験化合物が突然変異体SMOの阻害剤でないことが示される、方法を提供する。

10

20

30

40

50

## 【0012】

いくつかの実施形態では、本開示は、アミノ酸469で突然変異を組み込んでいる突然変異体SMOタンパク質のシグナル伝達を阻害する化合物についてスクリーニングする方法であって、該突然変異体SMOを試験化合物と接触させること、及び該化合物と該突然変異体SMOとの結合を検出することを含み、該試験化合物と該突然変異体SMOとの結合により、該試験化合物が突然変異体SMOの阻害剤であることが示される、方法を提供する。

## 【0013】

いくつかの実施形態では、本開示は、アミノ酸469で突然変異を組み込む突然変異体SMOタンパク質のシグナル伝達を阻害する化合物についてスクリーニングする方法であって、該突然変異体SMOを発現する細胞を試験化合物と接触させること、及び該細胞内のG1iの活性を検出することを含み、G1i活性の存在により、該試験化合物が突然変異体SMOの阻害剤でないことが示される、方法を提供する。

10

## 【0014】

いくつかの実施形態では、本開示は、配列番号6と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含み、該アミノ酸配列が、アミノ酸241でトレオニン以外のアミノ酸を含む、単離された突然変異体SMOタンパク質を提供する。いくつかの実施形態では、本単離された突然変異体SMOタンパク質は、配列番号6のアミノ酸配列を含み、該アミノ酸配列は、アミノ酸241でトレオニン以外のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、該アミノ酸配列は、アミノ酸241でメチオニン(M)を含む。

20

## 【0015】

いくつかの実施形態では、本開示は、配列番号8と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含み、該アミノ酸配列が、アミノ酸469でシステイン(C)以外のアミノ酸を含む、単離された突然変異体SMOタンパク質を提供する。いくつかの実施形態では、本単離された突然変異体SMOタンパク質は、配列番号8のアミノ酸配列を含み、該アミノ酸配列は、アミノ酸469でシステイン(C)以外のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、該アミノ酸配列は、アミノ酸469でチロシン(Y)を含む。

20

## 【0016】

いくつかの実施形態では、本開示は、ヘッジホッグ経路阻害剤を同定する方法であって、細胞をある量の試験薬剤と接触させることであって、該細胞が、ヘッジホッグタンパク質に応答するか、または増加したヘッジホッグシグナル伝達及び/もしくはヘッジホッグシグナル伝達経路の活性化を有し、該細胞が、本明細書に開示の突然変異体SMOタンパク質のいずれかを発現する、接触させることと、b)試験薬剤が細胞においてヘッジホッグシグナル伝達を阻害するかどうかを対照と比較して決定することであって、試験薬剤が対照と比べて細胞においてヘッジホッグシグナル伝達を阻害する場合には、試験薬剤がヘッジホッグ経路阻害剤として同定される、決定することと、を含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、細胞においてヘッジホッグシグナル伝達を阻害する試験薬剤の能力は、G1i1発現アッセイを使用して決定される。

30

## 【0017】

いくつかの実施形態では、本開示は、ヘッジホッグ経路阻害剤を同定する方法であって、細胞をある量の試験薬剤と接触させることであって、該細胞が、ヘッジホッグタンパク質に応答するか、または増加したヘッジホッグシグナル伝達及び/もしくはヘッジホッグシグナル伝達経路の活性化を有し、該細胞が、本明細書に開示の突然変異体SMOタンパク質のいずれかを発現する、接触させることと、b)試験薬剤が細胞の成長及び/または増殖を阻害するかどうかを対照と比較して決定することであって、試験薬剤が対照と比べて細胞の成長及び/または増殖を阻害する場合には、試験薬剤がヘッジホッグ経路阻害剤として同定される、決定することと、を含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、対照は、野生型SMOタンパク質を発現している細胞である。いくつかの実施形態では、対照は、試験薬剤と接触させた細胞と同じ突然変異体SMOタンパク質を発現している細胞であり、対照は、突然変異体SMOタンパク質が部分的または完全に耐性である対照薬

40

50

剤で処理される。いくつかの実施形態では、対照薬剤は、ビスマデギブ、LY2940680、LDE225、及び/または化合物5である。いくつかの実施形態では、試験薬剤は、突然変異体SMOタンパク質と結合するが、野生型SMOタンパク質とは結合しない。いくつかの実施形態では、試験薬剤は、突然変異体SMOタンパク質及び野生型SMOタンパク質の両方と結合する。いくつかの実施形態では、試験薬剤は、突然変異体SMOタンパク質を発現している細胞におけるヘッジホッグシグナル伝達経路の阻害において野生型SMOタンパク質を発現している細胞よりも有効である。いくつかの実施形態では、試験薬剤は、突然変異体SMOタンパク質を発現している細胞の成長及び/または増殖の阻害において野生型SMOタンパク質を発現している細胞よりも有効である。

【0018】

いくつかの実施形態では、本開示は、配列番号1と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含み、該アミノ酸配列がアミノ酸241でトレオニン以外のアミノ酸を含む、突然変異体SMOタンパク質をコードする単離された核酸分子を提供する。いくつかの実施形態では、突然変異体SMOタンパク質は、配列番号6のアミノ酸配列を含み、該アミノ酸配列は、アミノ酸241でメチオニン(M)を含む。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号5の親核酸配列を含み、該配列は、アミノ酸241をコードする配列を、異なるアミノ酸をコードするように変化させる突然変異を含む。

【0019】

いくつかの実施形態では、本開示は、配列番号1と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含み、該アミノ酸配列がアミノ酸469でシステイン(C)以外のアミノ酸を含む、突然変異体SMOタンパク質をコードする単離された核酸分子を提供する。いくつかの実施形態では、突然変異体SMOタンパク質は、配列番号8のアミノ酸配列を含み、該アミノ酸配列は、アミノ酸469でチロシン(Y)を含む。いくつかの実施形態では、単離された核酸分子は、配列番号5の親核酸配列を含み、該配列は、アミノ酸469をコードする配列を、異なるアミノ酸をコードするように変化させる突然変異を含む。

【0020】

いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書に開示の核酸のいずれかを含むベクターを提供する。

【0021】

いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書に開示のベクターのいずれかを含む宿主細胞を提供する。

【0022】

いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書に開示のベクターのいずれかを含み、かつそれを発現することができる宿主細胞を提供する。

【0023】

いくつかの実施形態では、本開示は、ヘッジホッグ経路阻害剤を同定する方法であって、細胞をある量の試験薬剤と接触させることであって、該細胞が、ヘッジホッグタンパク質に応答するか、または増加したヘッジホッグシグナル伝達及び/もしくはヘッジホッグシグナル伝達経路の活性化を有し、該細胞が、本明細書に開示のベクターのいずれかを発現する、接触させることと、b)試験薬剤が細胞においてヘッジホッグシグナル伝達を阻害するかどうかを対照と比較して決定することであって、試験薬剤が対照と比べて細胞においてヘッジホッグシグナル伝達を阻害する場合には、試験薬剤がヘッジホッグ経路阻害剤として同定される、決定することと、を含む方法を提供する。

【0024】

いくつかの実施形態では、細胞においてヘッジホッグシグナル伝達を阻害する試験薬剤の能力は、G1i1発現アッセイを使用して決定される。

【0025】

いくつかの実施形態では、本開示は、ヘッジホッグ経路阻害剤を同定する方法であって、細胞をある量の試験薬剤と接触させることであって、該細胞が、ヘッジホッグタンパク質に応答するか、または増加したヘッジホッグシグナル伝達及び/もしくはヘッジホッグ

10

20

30

40

50

シグナル伝達経路の活性化を有し、該細胞が、本明細書に開示のベクターのいずれかを発現する、接触させることと、b) 試験薬剤が細胞の成長及び/または増殖を阻害するかどうかを対照と比較して決定することであって、試験薬剤が対照と比べて細胞の成長及び/または増殖を阻害する場合には、試験薬剤がヘッジホッグ経路阻害剤として同定される、決定することと、を含む方法を提供する。

【0026】

いくつかの実施形態では、本開示は、試料中の突然変異体SMO遺伝子を検出する方法であって、該試料から、突然変異を含むことが疑われるSMOの第1の細胞外ループのカルボキシ末端またはその断片に対応する核酸を増幅することと、増幅された核酸の電気泳動移動度を、対応する野生型SMO遺伝子またはその断片の電気泳動移動度と比較することと、を含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、電気泳動移動度は、ポリアクリルアミドゲル上で決定される。

10

【0027】

いくつかの実施形態では、本開示は、試料中の突然変異体SMO遺伝子を検出する方法であって、該試料から、突然変異を含むことが疑われるSMOの膜貫通ドメイン6のカルボキシ末端またはその断片に対応する核酸を増幅することと、増幅された核酸の電気泳動移動度を、対応する野生型SMO遺伝子またはその断片の電気泳動移動度と比較することと、を含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、電気泳動移動度は、ポリアクリルアミドゲル上で決定される。

20

【0028】

いくつかの実施形態では、本開示は、試料中の少なくとも1つのSMO突然変異を同定する方法であって、該試料由来の核酸を、アミノ酸241をコードする配列をトレオニン以外のアミノ酸に変化させる突然変異を組み込んでいる突然変異SMOタンパク質またはその断片をコードする核酸に特異的にハイブリダイズすることができる核酸プローブと接触させることと、該ハイブリダイゼーションを検出することと、を含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、プローブは、検出可能に標識されている。いくつかの実施形態では、プローブは、アンチセンスオリゴマーである。いくつかの実施形態では、該核酸該試料中のSMO遺伝子またはその断片を増幅し、該プローブと接触させる。

30

【0029】

いくつかの実施形態では、本開示は、試料中の少なくとも1つのSMO突然変異を同定する方法であって、該試料由来の核酸を、アミノ酸469をコードする配列をシステイン以外のアミノ酸に変化させる突然変異を組み込んでいる突然変異SMOタンパク質またはその断片をコードする核酸に特異的にハイブリダイズすることができる核酸プローブと接触させることと、該ハイブリダイゼーションを検出することと、を含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、プローブは、検出可能に標識されている。いくつかの実施形態では、プローブは、アンチセンスオリゴマーである。いくつかの実施形態では、該核酸該試料中のSMO遺伝子またはその断片を増幅し、該プローブと接触させる。

30

【0030】

いくつかの実施形態では、本開示は、GDC-0449による治療に耐性であるヒト対象において腫瘍を同定する方法であって、該腫瘍の試料中の突然変異SMO遺伝子または突然変異SMOタンパク質の存在を決定することを含み、該突然変異SMO遺伝子が、アミノ酸241で突然変異を含むSMOタンパク質をコードし、該SMOタンパク質が、アミノ酸241で突然変異を含み、該突然変異SMO遺伝子または突然変異SMOタンパク質の存在により、該腫瘍がGDC-0449による治療に対して耐性であることが示される、方法を提供する。いくつかの実施形態では、本方法は、GDC-0449による治療に対して感受性がないか、もはや感受性がない腫瘍を有する該対象を、該突然変異SMOに結合する化合物で治療することをさらに含む。いくつかの実施形態では、該突然変異の存在または不在を核酸試料の検査によって決定する。いくつかの実施形態では、該突然変異の存在または不在をタンパク質試料の検査によって決定する。

40

【0031】

50

いくつかの実施形態では、本開示は、G D C - 0 4 4 9 による治療に耐性であるヒト対象において腫瘍を同定する方法であって、該腫瘍の試料中の突然変異 S M O 遺伝子または突然変異 S M O タンパク質の存在を決定することを含み、該突然変異 S M O 遺伝子が、アミノ酸 4 6 9 で突然変異を含む S M O タンパク質をコードし、該 S M O タンパク質が、アミノ酸 4 6 9 で突然変異を含み、該突然変異 S M O 遺伝子または突然変異 S M O タンパク質の存在により、該腫瘍が G D C - 0 4 4 9 による治療に対して耐性であることが示される、方法を提供する。いくつかの実施形態では、本方法は、G D C - 0 4 4 9 による治療に対して感受性がないか、もはや感受性がない腫瘍を有する該対象を、該突然変異 S M O に結合する化合物で治療することをさらに含む。いくつかの実施形態では、該突然変異の存在または不在を核酸試料の検査によって決定する。いくつかの実施形態では、該突然変異の存在または不在をタンパク質試料の検査によって決定する。

10

#### 【 0 0 3 2 】

いくつかの実施形態では、本開示は、異常なヘッジホッギナル伝達を有する細胞の増殖または成長を阻害する方法であって、該細胞にプロモドメイン阻害剤を投与することを含み、該細胞が、配列番号 1 のアミノ酸位置 2 4 1 または 4 6 9 に対応するアミノ酸位置のうちのいずれか 1 つ以上で突然変異を有するスムースンドタンパク質を発現する、方法を提供する。いくつかの実施形態では、細胞は対象中にある。いくつかの実施形態では、細胞は癌細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は S U F U 突然変異をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞はヒト細胞であり、該細胞は、S U F U 遺伝子のコピーの喪失をもたらす 1 0 q 欠失突然変異を含む。いくつかの実施形態では、1 0 q 欠失は、P T E N 遺伝子のコピーの喪失をもたらす。いくつかの実施形態では、プロモドメイン阻害剤は、I - B E T 7 6 2 、J Q 1 、または J Q 2 である。

20

#### 【 0 0 3 3 】

いくつかの実施形態では、本開示は、アミノ酸 2 4 1 をコードする配列中に突然変異を組み込んでいる突然変異 S M O タンパク質またはその断片をコードする核酸に特異的にハイブリダイズすることができる核酸プローブを提供する。いくつかの実施形態では、プローブは、突然変異 S M O または該その断片をコードする該核酸に相補的である。いくつかの実施形態では、プローブは、約 1 0 ~ 約 5 0 ヌクレオチドの長さを有する。いくつかの実施形態では、プローブは、検出可能な標識をさらに含む。

30

#### 【 0 0 3 4 】

いくつかの実施形態では、本開示は、アミノ酸 4 6 9 をコードする配列中に突然変異を組み込んでいる突然変異 S M O タンパク質またはその断片をコードする核酸に特異的にハイブリダイズすることができる核酸プローブを提供する。いくつかの実施形態では、プローブは、突然変異 S M O または該その断片をコードする該核酸に相補的である。いくつかの実施形態では、プローブは、約 1 0 ~ 約 5 0 ヌクレオチドの長さを有する。いくつかの実施形態では、プローブは、検出可能な標識をさらに含む。

#### 【 0 0 3 5 】

いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書に開示の突然変異体 S M O タンパク質のいずれかに特異的に結合する抗体であって、該抗体がアミノ酸 2 4 1 でトレオニンを有する野生型 S M O に結合しない、抗体を提供する。いくつかの実施形態では、本抗体は、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、単鎖抗体、またはこれらの抗原結合断片である。いくつかの実施形態では、本抗体は、細胞毒性剤にコンジュゲートされている。いくつかの実施形態では、本抗体は、検出可能な標識にコンジュゲートされている。いくつかの実施形態では、抗体は、S M O 活性を阻害する。

40

#### 【 0 0 3 6 】

いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書に開示の突然変異体 S M O タンパク質のいずれかに特異的に結合する抗体であって、該抗体のエピトープがアミノ酸 4 6 9 でシステインを有する野生型 S M O に結合しない、抗体を提供する。いくつかの実施形態では、本抗体は、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、単鎖抗体、またはこれらの抗原結合断片である。いくつかの実施形態では、本抗体は、細胞毒性剤にコンジュゲートさ

50

れている。いくつかの実施形態では、本抗体は、検出可能な標識にコンジュゲートされている。いくつかの実施形態では、抗体は、SMO活性を阻害する。

【図面の簡単な説明】

【0037】

【図1A-1I】野生型ヒトSMO(1A)及びいくつかのヒト突然変異体SMO(1B-1I)についてのアミノ酸配列を示す。図1Aは配列番号1を示す。図1Bは配列番号2を示す。図1Cは配列番号3を示す。図1Dは配列番号4を示す。図1Eは配列番号5を示す。図1Fは配列番号6を示す。図1Gは配列番号7を示す。図1Hは配列番号8を示す。図1Iは配列番号9を示す。

【図2】ビスマデギブ耐性BCCにおけるヘッジホッジ経路シグナル伝達レベルを決定するために行った実験の結果を示す。

【図3】治療前及び治療後の生検におけるSMO-A459V突然変異の頻度を決定するために行った実験の結果を示す。

【図4】W281突然変異を有するSMO突然変異体のビスマデギブ結合ポケットを示す。

【図5A】SMO-A459V突然変異体がPTCHに対して感受性があるかどうかを決定するために行った実験の結果を示す。

【図5B】SMO-A459V突然変異体がビスマデギブに対して感受性があるかどうかを決定するために行った実験の結果を示す。

【図5C】SMO-A459V、SMO-W281C、及びSMO-W535L突然変異体が活性化突然変異であるかどうかを決定するために行った実験の結果を示す。

【図5D】SMO-W281C突然変異体がPTCHに対して感受性があるかどうかを決定するために行った実験の結果を示す。

【図5E】SMO-W281C突然変異体がビスマデギブに対して感受性があるかどうかを決定するために行った実験の結果を示す。

【図5F】SMO-A459V及びSMO-W281Cがビスマデギブとの結合障害を有するかどうかを決定するために行った実験の結果を示す。

【図6A】Hh経路の概略図を示す。

【図6B】肺に転移した患者12(PT12)由来の孤発性BCCの初期奏功及び疾患進行を示すスキャン写真を示す。赤色の矢印は、治療前(PreRx)、ならびにビスマデギブ治療の4ヶ月後(病変サイズの減少を示す)及び37ヶ月後(疾患増悪を強調する)の胸部のコンピューター断層撮影(CT)スキャンにおける標的病変を示す。

【図6C】最初はビスマデギブに応答したが、その後、示す長さの治療の後で再発(黒色の矢印)したゴーリン症候群患者(PT10)由来の2つの局所進行性BCCの写真を示す。

【図6D】ビスマデギブ治療前及び11ヶ月後の患者9.1(PT09.1)由来の局所進行性孤発性BCCのヘマトキシリン及びエオジン(H&E)染色した部分を示す。再発した病変が非治療腫瘍の組織構造を維持したことに留意されたい。スケールバーは50μmを表す。

【図6E】ビスマデギブ耐性及び正常皮膚生検におけるGLI1及びMKI67発現レベルを示すグラフである。ピアソンの積率相関係数(R)=0.96。正規化した読み出し計数を示す。

【図6F】12人の再発性BCC患者において同定されたHh経路遺伝子及びTP53における遺伝的变化の表形式の概要である。生殖系列PTCH1変異体をゴーリンBCCについて報告し、一方で孤発性BCCについては体細胞突然変異のみを示す。2つの領域が明白に異なる生検を、PT06、PT08、及びPT09について同じ初発腫瘍の再成長時に得た。2つの別々のBCCが患者PT10において耐性を発現した。LOHをSNPアレイからのマイナー対立遺伝子頻度によって決定した。緑色のボックスは、後に突然変異体対立遺伝子のコピー数の増大が伴うLOH事象を強調する。対立遺伝子特異的発現をRNAseqによって決定した。

10

20

30

40

50

【図7】未治療の孤発性BCCにおいて同定されたSMO変異体を示す表である。SMO-A239Vはこれまでに報告されていない(COSMIC/dbSNP)が、他の全ては報告済の発癌性突然変異である。注記：標的化変異体コーリングはSMO-A239Vを同定したが、異なる読み値カットオフ及び低い感受性に起因して、体細胞変異体コーラーVariantToolsは同定しなかった。

【図8A】本研究で同定したSMO突然変異の表形式の概要を示す。全ての突然変異は、それらが同じ患者由来の血液中でも他の組織中でも検出されなかつたため、体細胞性であった。

【図8B】SMO TM領域の結晶構造(灰色の螺旋; Wangら、2013)にドッキングしたビスモデギブ(黄色)の計算モデルを示す。これまでに特性評価されていない突然変異体残基を緑色で強調する。

【図8C-F】生検前及び生検後のSMO突然変異の有病率を示す棒グラフである。棒グラフは、パイロシーケンス法によって決定して、PT03、PT04、及びPT12(8C)についてはSMO-A459V、PT09(8D)についてはSMO-V321M、PT10(8E)についてはSMO-C469Y及びSMO-T241M、ならびにPT11(8F)についてはSMO-L412Fに対応する位置での野生型(青色)ヌクレオチドまたは突然変異体(赤色)ヌクレオチドいずれかの組み込み頻度を示す。SMO突然変異はヘテロ接合性であることが予期され、SMOコピー数は最大Y軸値を決定することに留意されたい(PT03、PT04、PT12、PT10、及びPT11については50%(SMOコピー数は2)、PT09については25%(SMOコピー数は4))。突然変異体ヌクレオチドの組み込みは、全ての前処理試料においてパイロシーケンスアッセイのバックグラウンドレベル(5%未満)以内であると見なされた。4連アッセイからのデータを血液対照と比較してプロットする。エラーバーはデータの範囲を表す。

【図8G】最初はビスモデギブに応答したが、その後、示す期間の後で再発したPT11由来の局所進行性BCC(白色の矢印)の写真を示す。

【図9】SMOのタンパク質ドメイン内の未治療のBCC(薄灰色-S278I)、耐性BCC(黒色)、またはその両方(薄灰色-L412F、W535L)において同定した突然変異の場所を示す概略図である。アスタリスクは、これまでに報告されている発癌性突然変異を強調する。TM螺旋を青色の円柱で表す。

【図10A】SMO(灰色)と結合しているビスモデギブ(黄色)のトップダウン図を示し、薬物結合ポケットに対するW281、V321、I408、及びC469(全て緑色)の近接性を明らかにしている計算ドッキングモデルを示す。

【図10B】左は、ビスモデギブ(黄色)に対するV321及びW281(ともに緑色)の位置を示す。中央は、PT02由来のC281突然変異体がビスモデギブとの相互作用を分断する可能性が高いことを示す。右は、PT09由来のM321突然変異体がW281の立体構造に影響すると予測されることを示す。

【図10C】I408(左)のバリン(右)への突然変異がH470及びV404(その両方ともビスモデギブと相互作用する)のパッキングに影響すると予測されることを示す。この突然変異は、全体的なタンパク質骨格構造におけるさらに大きな変化を引き起こし、したがって、セカンドシェル効果を介した薬物結合に影響し得る。全てのパネルにおいて、突然変異残基は赤色の文字で強調する。

【図11A】示すSMOコンストラクトでトランスフェクトしたC3H10T1/2細胞におけるG1i-ルシフェラーゼレポーター活性を示すグラフである。値をSMO-WT活性に対して正規化し、プロットしたデータは3連実験の平均+/-SDである。

【図11B】示す割合のPTCH1対SMO発現コンストラクトでトランスフェクトしたC3H10T1/2細胞におけるG1i-ルシフェラーゼレポーターアッセイからの結果を示すグラフである。値をPTCH1コトランスフェクトなしの活性に対して正規化し、プロットしたデータは3連実験の平均+/-SDである。

【図11C】HEK-293細胞におけるSMO薬物結合ポケット突然変異体の細胞表面発現を示す表である。示す値は、10,000の細胞事象についてのFACSならびに空

10

20

20

30

40

50

ベクターでトランスフェクトした細胞及びヨウ化プロピジウム(PI)に対するゲーティングによって決定した、SMOの細胞表面発現を有する生細胞のパーセンテージである。

【図11D】非形質導入(ウイルスなし)、対照ウイルス(tRFPのみ)、またはCreウイルス(tRFP-IRES-eGFPcre)のいずれかに感染させた患者の、SHHとともにまたはSHHなしで培養した小脳顆粒ニューロン前駆細胞のメチル-[<sup>3</sup>H]-チミジン組み込みからの結果を示すグラフである。メチル-[<sup>3</sup>H]-チミジン組み込みを1分当たりの計数(CPM)で表し、プロットしたデータは3連実験の平均+/-SDである。

【図11E】10,000の細胞事象についてのFACS及び非形質導入細胞に対するゲーティングによって決定した、示すウイルスコンストラクトによる感染後のtdTomato発現について陽性であるPtcch110xp/10xp Tp5310xp/10xp Rosa26LSL-tdTomato(PPT)小脳顆粒ニューロン前駆細胞(CGNP)のパーセンテージを示す棒グラフである。

【図11F】定量的RT-PCRによるパネルEからのPPT CGNPにおけるヒトSMO mRNAレベルの定量化を示す棒グラフである。データは、マウスハウスキーピング遺伝子Rp119に対する2-Ct値であり、3連実験の平均+/-SDとしてプロットする。

【図12A】示すSMOコンストラクトでトランスフェクトしたC3H10T1/2細胞における、ビスモデギブによる用量応答後の正規化したG1i-ルシフェラーゼレポーター活性を示すグラフである。値を非治療活性に対して正規化し、プロットしたデータは3連実験の平均+/-標準偏差(SD)である。IC50値を、非線形回帰適合化の後に計算した。

【図12B】示すSMOコンストラクトでトランスフェクトしたHEK-293細胞との[<sup>3</sup>H]-ビスモデギブの結合を示す棒グラフである。EVは空ベクターを意味し、薬物結合は1分当たりの計数(cpm)で測定した。特異的結合を、全結合から非特異的結合を減算することによって過剰の非標識ビスモデギブとの競合の後に計算した。示すデータは平均+/-SDである。

【図12C】一次CGNPのウイルス形質導入スキームの図である。形質導入したCGNPのみがSHHの非存在下で増殖し、SMO変異体がビスモデギブの存在下で増殖を促進する能力を具体的に試験することを可能にする。

【図12D】SHHリガンドの除去後のビスモデギブによる用量応答に続く示すウイルスで形質導入したPPT CGNPの正規化したメチル-[<sup>3</sup>H]-チミジン組み込みを示す一連のグラフである。各グラフは、同じ対照データを示す。プロットしたデータは3連実験の平均+/-SDである。

【図13A】合計21残基(濃灰色の球)が、SMO TM構造(灰色の螺旋)に結合したビスモデギブ(薄灰色の球)の4.5以内の原子を有することが予測されることを示すモデルである。

【図13B】N219、D384、及びS387が水素結合ネットワーク(破線)を形成することを示すモデルである。これらの残基のうちのいずれかの突然変異は、ビスモデギブ結合ポケットの形状を変化させる可能性が高い。

【図13C】示すSMOコンストラクトでトランスフェクトし、1μMのビスモデギブで処理したC3H10T1/2細胞におけるG1i-ルシフェラーゼレポーター活性を示す。値を各コンストラクトについて非処理活性レベルに対して正規化し、プロットしたデータは3連実験の平均+/-SDである。

【図14A】SMO TM領域の結晶構造(灰色の螺旋; Wangら、2013)にドッキングしたビスモデギブ(薄灰色の球)の計算モデルを示す。薬物結合ポケットに対して遠位の突然変異残基を暗灰色で強調する。

【図14B】示すSMOコンストラクトでトランスフェクトしたC3H10T1/2細胞におけるG1i-ルシフェラーゼレポーター活性からの結果を示す棒グラフである。値をSMO-WTの活性レベルに正規化し、プロットしたデータは3連実験の平均+/-SD

10

20

30

40

50

である。

【図14C】示すS M OコンストラクトでトランスフェクトしたC 3 H 1 0 T 1 / 2細胞における、ビスマデギブによる用量応答後の正規化したG 1 i - ルシフェラーゼレポーター活性を示すグラフである。プロットしたデータは3連実験の平均+/-SDである。

【図14D】S H Hリガンドの除去後のビスマデギブによる用量応答に続く示すウイルスで形質導入したP P T C G N Pの正規化したメチル-[3H]-チミジン組み込みを示すグラフである。プロットしたデータは3連実験の平均+/-SDである。

【図15A】示すS M OコンストラクトでトランスフェクトしたC 3 H 1 0 T 1 / 2細胞における、ビスマデギブによる用量応答後の正規化したG 1 i - ルシフェラーゼレポーター活性を示すグラフである。プロットしたデータは3連実験の平均+/-SDである。 10

【図15B】示す割合のP T C H 1対S M O発現コンストラクトでトランスフェクトしたC 3 H 1 0 T 1 / 2細胞におけるG 1 i - ルシフェラーゼレポーターアッセイからの結果を示すグラフである。値をP T C H 1コトランスフェクトなしの活性に対して正規化し、プロットしたデータは3連実験の平均+/-SDである。

【図15C】示すS M OコンストラクトでトランスフェクトしたH E K - 2 9 3細胞との[3H]-ビスマデギブの結合を例示する棒グラフである。トランスフェクトしていない細胞(U n)及び空ベクター(E V)でトランスフェクトした細胞を対照として含めた。薬物結合を1分当たりの計数(c p m)で測定し、特異的結合を、全結合から非特異的結合を減算することによって過剰の非標識ビスマデギブとの競合の後に計算した。

【図15D】H E K - 2 9 3細胞における活性化S M O突然変異体の細胞表面発現を示す表である。示す値は、1 0 , 0 0 0の細胞事象についてのF A C Sならびに空ベクターでトランスフェクトした細胞及びP Iに対するゲーティングによって決定した、S M Oの細胞表面発現を有する生細胞のパーセンテージである。 20

【図15E】S H Hリガンドの除去後のビスマデギブによる用量応答に続く示すウイルスで形質導入したP P T C G N Pの正規化したメチル-[<sup>3</sup>H]-チミジン組み込みを示すグラフである。プロットしたデータは3連実験の平均+/-SDである。2つの独立した実験を示す。

【図16A】様々なS M O変異体で形質導入し、5 0 0 n Mの示す化合物で処理したP P T C G N Pの正規化したメチル-[<sup>3</sup>H]-チミジン組み込みを示す。検査した野生型(W T)またはS M O突然変異体に対するデータの各セットについて、以下の処理条件の各々に対するデータを、左から右へ、以下の順序で棒により表す:ビスマデギブ、L Y 2 9 4 0 6 8 0、L D E 2 2 5、及び化合物5。値を薬物なしの増殖レベルに対して正規化し、プロットしたデータは3連実験の平均+/-SDである。薬物の存在下でのS M O - W Tの残存増殖は、これらの一次C G N P培養の線維芽細胞及びグリア汚染に起因することに留意されたい。 30

【図16B】16Aと同じデータを示すが、形質導入したC G N Pを1 μ MビスマデギブまたはJ Q 1のいずれかで処理した。残存増殖はJ Q 1によるS M O - W Tにおいてより少なく、このことは、この化合物がH h依存性細胞増殖も阻害することを示唆する。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0 0 3 8】

本開示の1つの発見は、ヘッジホッグ依存性腫瘍の化学療法に対する耐性と関連する突然変異事象がスムースンド(S M O)で生じ、この事象が、シクロパミン及びG D C - 0 4 4 9などのヘッジホッグシグナル伝達を阻害する化合物による治療に対する腫瘍の耐性を付与することである。本開示は、ヘッジホッグシグナル伝達に依存的な癌の予後判定剤、診断剤、及び治療剤として有用な組成物及び方法を提供する。

##### 【0 0 3 9】

本明細書で記載または参照する技法及び手順は、一般に十分に理解され、従来の方法を用いて当業者によって一般的に利用されており、例えば、S a m b r o o k e t a l . , M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l 3 r d . e d i t i o n ( 2 0 0 1 ) C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o

10

20

30

40

50

ratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.、Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel, et al. eds., (2003))、the series Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.) : PCR 2: A Practical Approach (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds. (1995)) , Harlow and Lane, eds. (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, and Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed. (1987))、Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984)、Methods in Molecular Biology, Humana Press、Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Celli, ed., 1998) Academic Press、Animal Cell Culture (R.I. Freshney), ed., 1987)、Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather and P.E. Roberts, 1998) Plenum Press、Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G. Newell, eds., 1993-8) J.Wiley and Sons、Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir and C.C. Blakewell, eds.)、Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987)、PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994)、Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan et al., eds., 1991)、Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999)、Immunobiology (C.A. Janeway and P. Travers, 1997)、Antibodies (P. Finch, 1997)、Antibodies: A Practical Approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989)、Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000)、Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999)、The Antibodies (M. Zanetti and J.D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995)、及びCancer: Principles and Practice of Oncology (V.T. DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Company, 1993)に記載されている、広く利用されている方法などがある。引用文献は、その全体が参照により組み込まれている。

#### 【0040】

本明細書を解釈する目的のために、以下の定義が適用され、適切な場合は常に、単数形で使用される用語は複数形も含み、その逆も同様である。以下に示される任意の定義が、参照により本明細書に組み込まれている任意の文書と矛盾する場合は、以下に示される定義が優先するものとする。

#### 【0041】

本開示をさらなる詳述に進む前に、本開示は特定の組成物または処理ステップに限定されないため、異なり得ることが理解されるべきである。本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「a」、「an」、及び「the」は、文脈が別途明確に指

10

20

30

40

50

示しない限り、複数の指示対象を含むことに留意する必要がある。

【0042】

別途定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本開示が関係する当業者によって一般的に理解される意味と同じ意味を有する。例えば、the Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press, The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press、及びthe Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Pressは、本開示で使用される用語の多くの一般的な使用法を当業者に提供する。  
10

【0043】

アミノ酸は、本明細書では、それらの一般に知られている三文字記号、またはIUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commissionによって推奨される一文字記号のいずれかによって言及され得る。ヌクレオチドも同様に、それらの一般に受け入れられている一文字コードによって参照され得る。

【0044】

本明細書で使用される「及び／または」は、2つの指定の特徴または構成要素の一方の、他方を伴うまたは伴わない具体的な開示として理解されるべきであることを指摘しておくことが有用である。例えば、「A及び／またはB」は、(i) A、(ii) B、ならびに(iii) A及びBの具体的な開示として、各々が本明細書において個々に示されたるとまさに同じように、理解されるべきである。  
20

【0045】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、及び「タンパク質」という用語は、本明細書で互換的に使用され、アミノ酸残基のポリマーを指す。これらの用語は、1つ以上のアミノ酸残基が対応する天然に存在するアミノ酸の人工の化学的模倣体であるアミノ酸ポリマー、ならびに天然に存在するアミノ酸ポリマー及び天然に存在しないアミノ酸ポリマーに適用される。本明細書で使用する場合、「ポリペプチド」、「ペプチド」、及び「タンパク質」は、少なくとも、本明細書に記載の突然変異体SMOタンパク質、変異体、またはその断片のいずれかを包含する。  
30

【0046】

本明細書中の「抗体」という用語は、最も広い意味で使用され、具体的には、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、少なくとも2つのインタクト抗体から形成された多特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、及び所望の生物活性を示す限りは抗体断片を網羅する。

【0047】

「単離された」抗体は、その天然の環境の成分から同定され、かつ分離及び／または回収されたものである。その天然の環境の夾雑物成分は、抗体の研究、診断的または治療的な使用を妨害する材料であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質性または非タンパク質性の溶質を含み得る。いくつかの実施形態では、抗体は、(1)例えば、ローリー方法によって決定したとき、抗体の95重量%超まで、いくつかの実施形態では、99重量%超まで、(2)例えば、スピニングカップシーケネーターの使用によって、N末端もしくは内部アミノ酸配列の少なくとも15個の残基を得るのに十分な程度まで、または(3)例えば、クマシープルーもしくは銀染色を用いる、還元もしくは非還元条件下でのSDS-PAGEによって均一になるまで精製される。抗体の天然の環境の少なくとも1つの成分が存在しないので、単離された抗体は、組換え細胞内のインサイチュの抗体を含む。しかしながら、通常は、単離された抗体は、少なくとも1つの精製ステップによって調製される。  
40

【0048】

50

「ネイティブ抗体」は、通常、2本の同一の軽(L)鎖及び2本の同一の重(H)鎖から構成される、約150,000ダルトンのヘテロ四量体の糖タンパク質である。各々の軽鎖は、1つの共有結合的ジスルフィド結合によって重鎖と連結されているが、ジスルフィド結合の数は、異なる免疫グロブリンアイソタイプの重鎖間で異なる。各々の重鎖及び軽鎖は、規則的な間隔の鎖内ジスルフィド架橋も有する。各々の重鎖は、一方の末端に可変ドメイン( $V_H$ )と、それに続く、ある数の定常ドメインを有する。各々の軽鎖は、一方の末端に可変ドメイン( $V_L$ )、そのもう一方の末端に定常ドメインを有しており、重鎖の定常ドメインは、重鎖の最初の定常ドメインと整列し、軽鎖可変ドメインは、重鎖の可変ドメインと整列する。特定のアミノ酸残基は、軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインの間の界面を形成すると考えられている。

10

#### 【0049】

抗体の「可変領域」または「可変ドメイン」は、抗体の重鎖または軽鎖のアミノ末端ドメインを指す。重鎖の可変ドメインは、「 $V_H$ 」と称してもよい。これらのドメインは、通常、抗体の最も変化しやすい部分であり、抗原結合部位を含む。

#### 【0050】

「可変」という用語は、可変ドメインの特定の部分の配列が抗体間で大きく異なることを指し、その特定の抗原に対する各々の特定の抗体の結合及び特異性において使用される。しかしながら、可変性は、抗体の可変ドメインの全体にわたって均等に分布しているわけではない。それは、軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインの両方の超可変領域(HVR)と呼ばれる3つのセグメントに集中している。可変ドメインのより高度に保存された部分はフレームワーク領域(FR)と呼ばれる。ネイティブな重鎖及び軽鎖の可変ドメインは各々、3つのHVRによって接続された、主にベータ-シート立体配置を取る4つのFR領域を含み、これは、ベータ-シート構造を接続し、場合によっては、その一部を形成するループを形成する。各鎖中のHVRは、FR領域によって極めて近接して結び付けられ、他方の鎖のHVRは、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)を参照されたい)。定常ドメインは、抗体と抗原との結合に直接関与しないが、抗体依存性細胞傷害性における抗体の関与などの、様々なエフェクター機能を示す。

20

#### 【0051】

任意の脊椎動物種由来の抗体(免疫グロブリン)の「軽鎖」は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ(κ)及びラムダ(λ)と呼ばれる2つの明白に異なる種類のうちの1つに割り当てることができる。

30

#### 【0052】

その重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、抗体(免疫グロブリン)を異なるクラスに割り当てることができる。主要な免疫グロブリンクラスは、IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMの5つであり、これらのうちのいくつかは、サブクラス(アイソタイプ)、例えば、IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>、IgA<sub>1</sub>、及びIgA<sub>2</sub>へとさらに分けることができる。異なる免疫グロブリンクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、 $\alpha$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、及び $\mu$ と呼ばれる。異なる免疫グロブリンクラスのサブユニット構造及び三次元立体配置は周知であり、例えば、Abbas et al. Cellular and Mol. Immunology, 4th ed. (W. B. Saunders, Co., 2000)に概して記載されている。抗体は、抗体と1つ以上の他のタンパク質またはペプチドとの共有結合的または非共有結合的な会合によって形成された、より大きな融合分子の一部であってもよい。

40

#### 【0053】

「完全長抗体」、「インタクト抗体」、及び「完全抗体」という用語は、以下に定義する抗体断片ではなく、その実質的にインタクトな形態の抗体を指すよう、本明細書では互換的に使用される。本用語は、特に、Fc領域を含む重鎖を有する抗体を指す。

50

## 【0054】

本明細書の目的のための「裸の抗体」は、細胞傷害性部分または放射性標識にコンジュゲートされていない抗体である。

## 【0055】

「抗体断片」は、インタクト抗体の一部を含み、いくつかの実施形態では、その抗原結合領域を含む。抗体断片の例には、F<sub>a b</sub>、F<sub>a b'</sub>、F<sub>(a b')</sub><sub>2</sub>、及びF<sub>v</sub>断片；ダイアボディー；直鎖抗体；単鎖抗体分子；ならびに抗体断片から形成された多特異性抗体が含まれる。

## 【0056】

抗体のパパイン消化により、各々が单一の抗原結合部位を有する、「F<sub>a b</sub>」断片と呼ばれる2つの同一の抗原結合断片、及びその名前が容易に結晶化するその能力を反映している残りの「F<sub>c</sub>」断片が生じる。ペプシン処理により、2つの抗原結合部位を有し、依然として抗原を架橋することができるF<sub>(a b')</sub><sub>2</sub>断片が得られる。

10

## 【0057】

「F<sub>v</sub>」は、完全な抗原結合部位を含む最小の抗体断片である。一実施形態では、二本鎖のF<sub>v</sub>種は、非共有結合的に密に会合した1つの重鎖可変ドメイン及び1つの軽鎖可変ドメインの二量体からなる。単鎖F<sub>v</sub>(scF<sub>v</sub>)種では、1つの重鎖可変ドメイン及び1つの軽鎖可変ドメインは、軽鎖及び重鎖が、二本鎖のF<sub>v</sub>種のものと類似した「二量体」構造で会合できるように、柔軟なペプチドリンカーによって共有結合させることができる。各々の可変ドメインの3つのHVRが相互作用してVH-VL二量体の表面上の抗原結合部位を定義するのは、この立体配置においてである。集合的に、6つのHVRが抗体に抗原結合の特異性を付与する。しかしながら、单一の可変ドメイン（または抗原に対して特異的な3つのHVRしか含まない半分のF<sub>v</sub>）さえも、結合部位全体よりも低い親和性ではあるが、抗原を認識及び結合する能力を有する。

20

## 【0058】

F<sub>a b</sub>断片は、重鎖及び軽鎖可変ドメインを含み、軽鎖の定常ドメイン及び重鎖の最初の定常ドメイン（CH1）も含む。F<sub>a b'</sub>断片は、抗体ヒンジ領域由来の1以上のシステインを含む、重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端での数個の残基の付加により、F<sub>a b</sub>断片とは異なる。F<sub>a b'</sub>-SHは、定常ドメインのシステイン残基（複数可）が遊離チオール基を有するF<sub>a b'</sub>の本明細書における名称である。F<sub>(a b')</sub><sub>2</sub>抗体断片は、当初は、その間にヒンジシステインを有するF<sub>a b'</sub>断片の対として生成された。抗体断片の他の化学的結合も既知である。

30

## 【0059】

「単鎖F<sub>v</sub>」または「scF<sub>v</sub>」抗体断片は、抗体のVH及びVLドメインを含み、これらのドメインは、单一のポリペプチド鎖中に存在する。通常、scF<sub>v</sub>ポリペプチドは、VHドメインとVLドメインの間にポリペプチドリンカーをさらに含み、これにより、scF<sub>v</sub>が抗原結合のための所望の構造を形成することが可能となる。scF<sub>v</sub>の総説については、例えば、Pluckthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York, 1994), pp. 269-315を参照されたい。

40

## 【0060】

「ダイアボディー」という用語は、軽鎖可変ドメイン（VL）と接続された重鎖可変ドメイン（VH）と同じポリペプチド鎖（VH-VL）中に含む、2つの抗原結合部位を有する抗体断片を指す。同じ鎖上の2つのドメイン間の対合を可能にするには短すぎるリンカーを使用することによって、これらのドメインは、別の鎖の相補的ドメインと対合して2つの抗原結合部位を作り出すことを強いられる。ダイアボディーは、二価または二重特異性であることができる。ダイアボディーは、例えば、EP404,097、WO1993/01161、Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003)、及び Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:11076-11080 (1993)を参照されたい。

50

. S c i . U S A , 9 0 : 7 8 8 9 - 7 8 9 3 ( 1 9 9 3 ) に、より完全に記載されている。トリアボディー及びテトラボディーも、H u d s o n e t a l . , N a t . M e d . 9 : 1 2 9 - 1 3 4 ( 2 0 0 3 ) に記載されている。

#### 【 0 0 6 1 】

本明細書で使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られた抗体を指す、すなわち、この集団を構成する個々の抗体は、わずかな量で存在し得る潜在的な突然変異、例えば、天然に存在する突然変異以外は同一である。したがって、「モノクローナル」という修飾語は、抗体の特徴が個別の抗体の混合物ではないことを示す。特定の実施形態では、そのようなモノクローナル抗体には、通常、標的に結合するポリペプチド配列を含む抗体が含まれ、標的に結合するポリペプチド配列は、複数のポリペプチド配列から標的に結合する単一のポリペプチド配列を選択することが含まれるプロセスによって得られたものである。例えば、選択プロセスは、ハイブリドーマクローン、ファージクローン、または組換えDNAクローンのプールなどの複数のクローンからの、独特のクローンの選択であることができる。選択された標的結合配列は、例えば、標的に対する親和性を改善するため、標的結合配列をヒト化するため、細胞培養物中でのその產生を改善するため、そのインビボでの免疫原性を低下させるため、多特異性抗体を創出するためなどの目的でさらに変化させることができ、また、変化した標的結合配列を含む抗体も本開示のモノクローナル抗体であることが理解されるべきである。通常、異なる決定基(エピトープ)を対象とした異なる抗体が含まれるポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各々のモノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基を対象としている。その特異性に加えて、モノクローナル抗体調製物は、それらが、通常、他の免疫グロブリンに汚染されていないという点で有利である。

10

20

30

40

50

#### 【 0 0 6 2 】

「モノクローナル」という修飾語は、抗体の特徴が実質的に均一な抗体の集団から得られたものであることを示し、該修飾語は、抗体を特定の方法によって產生することを要するものと解釈されるべきでない。例えば、本発明に従って用いられるモノクローナル抗体は、例えば、ハイブリドーマ法(例えば、Kohler and Milstein, *Nature*, 256: 495-97 (1975)、Hongo et al., *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995)、Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988)、Hammerling et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981))、組換えDNA法DNA(例えば、米国特許第4,816,567号を参照)、ファージディスプレイ技術(例えば、Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991)、Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992)、Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338 (2): 299-310 (2004)、Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340 (5): 1073-1093 (2004)、Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (34): 12467-12472 (2004)、及びLee et al., *J. Immunol. Methods* 284 (1-2): 119-132 (2004)、ならびにヒト免疫グロブリン遺伝子座またはヒト免疫グロブリン配列をコードする遺伝子の一部または全てを有する動物中でヒトまたはヒト様抗体を產生させる技術(例えば、WO 1998/24893、WO 1996/34096、WO 1996/33735、WO 1991/10741、Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993)、Jakobovits et al., *Nature* 362: 255-258 (1993)、Bruggemann et al., *Year in Immunol.* 7: 33 (1993)、米国特許第5,545,807号、第5,545,806号、第5,569,825号、第5,625,126号

、第5,633,425号、及び第5,661,016号、Marks et al., Bio/Technology 10:779-783 (1992)、Lonberg et al., Nature 368: 856-859 (1994)、Morrison, Nature 368: 812-813 (1994)、Fishwild et al., Nature Biotechnol. 14: 845-851 (1996)、Neuberger, Nature Biotechnol. 14: 826 (1996)、及びLonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994)、13: 65-93 (1995)を参照)。

## 【0063】

本明細書中のモノクローナル抗体には、特に、重鎖及び/または軽鎖の一部が、特定の種に由来するかまたは特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一または相同である一方で、鎖(複数可)の残りの部分が、別の種に由来するかまたは別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一または相同である「キメラ」抗体、ならびに所望の生物活性を示す限りは、そのような抗体の断片が具体的に含まれる(例えば、米国特許第4,816,567号;及びMorrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855 (1984)を参照)。キメラ抗体には、抗体の抗原結合領域が、例えば、マカクザルを関心の抗原で免疫化することによって產生された抗体に由来する、PRIMATIZED(登録商標)抗体が含まれる。

## 【0064】

非ヒト(例えば、マウス)抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小限の配列を含むキメラ抗体である。一実施形態では、ヒト化抗体は、レシピエントのHVR由来の残基が、所望の特異性、親和性、及び/または能力を有するマウス、ラット、ウサギ、または非ヒト靈長類などの非ヒト種のHVR由来の残基(ドナー抗体)によって置き換えられているヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。場合によっては、ヒト免疫グロブリンのFR残基が、対応する非ヒト残基によって置き換えられている。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体中に見られない残基を含み得る。これらの修飾は、抗体の性能をさらに洗練させるために行なうことができる。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、通常2つの可変ドメインの実質的に全てを含み、このドメイン内では、超可変ループの全てまたは実質的に全てが非ヒト免疫グロブリンのものに対応しており、FRの全てまたは実質的に全てがヒト免疫グロブリン配列のものである。ヒト化抗体は、任意に、免疫グロブリン定常領域(Fc)、通常、ヒト免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部も含む。さらなる詳細については、例えば、Jones et al., Nature 321: 522-525 (1986)、Riechmann et al., Nature 332: 323-329 (1988)、及びPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992)を参照されたい。また、例えば、Vaswani and Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1: 105-115 (1998)、Harris, Biochem. Soc. Transactions 23: 1035-1038 (1995)、Hurle and Gross, Curr. Op. Biotech. 5: 428-433 (1994)、ならびに米国特許第6,982,321号及び第7,087,409号を参照されたい。

## 【0065】

「ヒト抗体」は、ヒトによって產生される抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を保有し、かつ/または本明細書に開示されたヒト抗体を作製する技術のうちのいずれかを用いて作製されたものを指す。ヒト抗体のこの定義は、具体的には、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を除外する。ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリーを含む、当技術分野で既知の様々な技術を用いて產生することができる。Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381 (1991)、Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581 (1991)。Col

10

20

30

40

50

e et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985)、Boerner et al., J. Immunol., 147 (1): 86-95 (1991)に記載されている方法もまた、ヒトモノクローナル抗体の調製に利用可能である。van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol., 5: 368-74 (2001)も参照されたい。ヒト抗体は、抗原刺激に応答してそのような抗体を産生するように変化させられているが、その内在性の遺伝子座が無効化されているトランスジェニック動物、例えば、免疫化された xenomouse に抗原を投与することによって調製することができる (XENOMOUSE (商標) 技術に関しては、例えば、米国特許第 6,075,181 号及び第 6,150,584 号を参照されたい)。また、例えば、ヒト B 細胞ハイブリドーマ技術を介して生成されるヒト抗体に関しては、Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103: 3557-3562 (2006) を参照されたい。  
10

#### 【0066】

「超可変領域」、「HVR」、または「HV」という用語は、本明細書で使用される場合、配列が超可変性であり、かつ / または構造的に定義されたループを形成する、抗体可変ドメインの領域を指す。通常、抗体は、6つのHVR; VH中に3つ (H1、H2、H3)、及び VL 中に3つ (L1、L2、L3) を含む。ネイティブ抗体では、H3 及び L3 が 6つのHVR のうちで最大の多様性を示し、特に H3 は、抗体に細かい特異性を付与することにおいて独特の役割を果たすと考えられている。例えば、Xu et al., Immunity 13: 37-45 (2000)、Johnson and Wu, in Methods in Molecular Biology 248: 1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003) を参照されたい。実際に、重鎖のみからなる、天然に存在するラクダ科抗体は、軽鎖の非存在下で機能的であり、かつ安定である。例えば、Hammers-Casterman et al., Nature 363: 446-448 (1993)、Sheriff et al., Nature Struct. Biol. 3: 733-736 (1996) を参照されたい。  
20

#### 【0067】

ある数のHVRの描写が用いられており、本明細書に包含される。Kabat 相補性決定領域 (CDR) は配列の可変性に基づいており、最も一般的に使用されている (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。Chothia は、その代わりに、構造ループの場所に言及している (Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987))。AbM HVR は、Kabat のHVRとChothia の構造ループの折衷物を表しており、Oxford Molecular のAbM 抗体モデリングソフトウェアによって使用されている。「接触」HVR は、利用可能な複雑な結晶構造の分析に基づいている。これらのHVRの各々に由来する残基を以下に記載する。  
30

#### 【0068】

##### ループ C 接触

-----  
 L 1 L L L L 3 0 - L 3 6  
 L 2 L L L L 4 6 - L 5 5  
 L 3 L L L L 8 9 - L 9 6  
 H 1 H 3 1 - H 3 5 B H 2 6 - H 3 5 B H H 3 0 (Kabat 付番)  
 H 1 H H H H 3 0 (Chothia 付番)  
 H 2 H H H H 4 7 - H 5 8  
40  
50

H 3 H 9 5 - H 1 0 2 H 9 5 - H 1 0 2 H 9 H 9 3 - H 1 0 1

H V R は、以下のような「伸長したH V R」を含んでもよい：V L 中の 2 4 ~ 3 6 または 2 4 ~ 3 4 ( L 1 )、4 6 ~ 5 6 または 5 0 ~ 5 6 ( L 2 )、及び 8 9 ~ 9 7 または 8 9 ~ 9 6 ( L 3 )、ならびに V H 中の 2 6 ~ 3 5 ( H 1 )、5 0 ~ 6 5 または 4 9 ~ 6 5 ( H 2 )、及び 9 3 ~ 1 0 2 、9 4 ~ 1 0 2 、または 9 5 ~ 1 0 2 ( H 3 )。可変ドメイン残基は、これらの定義の各々について、前出の Kabat に従って付番されている。

【 0 0 6 9 】

「フレームワーク」または「F R」残基は、本明細書で定義したような H V R 残基以外の可変ドメイン残基である。

【 0 0 7 0 】

「Kabat の可変ドメイン残基の付番」または「Kabat のアミノ酸位置の付番」という用語、及びその変化形は、前出の Kabat における抗体の編成の重鎖可変ドメインまたは軽鎖可変ドメインに用いられる付番システムを指す。この付番システムを用いると、実際の線状アミノ酸配列は、可変ドメインの F R もしくは H V R の短縮、または可変ドメインの F R もしくは H V R への挿入に対応する、より少ないまたは追加のアミノ酸を含み得る。例えば、重鎖可変ドメインは、H 2 の残基 5 2 の後ろの単一のアミノ酸挿入 ( Kabat による残基 5 2 a ) ならびに重鎖 F R 残基 8 2 の後ろの挿入された残基 ( 例えば、Kabat による残基 8 2 a 、8 2 b 、及び 8 2 c など ) を含み得る。残基の Kabat 付番は、相同性領域での抗体の配列と「標準的な」 Kabat 付番配列との整列によって、所定の抗体について決定することができる。

【 0 0 7 1 】

Kabat 付番システムは、通常、可変ドメイン中の残基 ( 軽鎖の残基 1 ~ 1 0 7 付近及び重鎖の残基 1 ~ 1 1 3 付近 ) に言及するときに使用される ( 例えば、Kabat et al. , Sequences of Immunological Interest . 5 th Ed . Public Health Service , National Institutes of Health , Bethesda , Md . ( 1 9 9 1 ) ) 。「EU付番システム」または「EU指標」は、通常、免疫グロブリン重鎖定常領域中の残基に言及するときに使用される ( 例えば、前出の Kabat に報告されている EU 指標 ) 。「Kabat の EU 指標」は、ヒト Ig G 1 EU 抗体の残基の付番を指す。本明細書で特に記述しない限り、抗体の可変ドメイン中の残基番号への言及は、Kabat 付番システムによる残基付番を意味する。本明細書で特に記述しない限り、抗体の定常ドメイン中の残基番号への言及は、EU付番システムによる残基付番を意味する ( 例えば、米国仮出願第 6 0 / 6 4 0 , 3 2 3 号、EU付番の図を参照されたい ) 。

【 0 0 7 2 】

「親和性成熟した」抗体は、その 1 つ以上の H V R 中に 1 つ以上の変化を有する抗体であり、これらの 1 つ以上の変化は、それらの変化 ( 複数可 ) を保有しない親抗体と比較して、抗原に対する抗体の親和性の改善をもたらす。一実施形態では、親和性成熟した抗体は、標的抗原に対するナノモル濃度またはさらにはピコモル濃度の親和性を有する。親和性成熟した抗体は、当技術分野で既知の特定の手順を用いて產生することができる。例えば、Marks et al . Bio / Technology 1 0 : 7 7 9 - 7 8 3 ( 1 9 9 2 ) は、V H 及び V L のドメインシャフリングによる親和性成熟を記載している。H V R 及び / またはフレームワーク残基のランダム突然変異生成は、例えば、Barbasa et al . Proc Nat . Acad . Sci . USA 9 1 : 3 8 0 9 - 3 8 1 3 ( 1 9 9 4 ) 、Schier et al . Gene 1 6 9 : 1 4 7 - 1 5 5 ( 1 9 9 5 ) 、Yelton et al . J . Immunol . 1 5 5 : 1 9 9 4 - 2 0 0 4 ( 1 9 9 5 ) 、Jackson et al . , J . Immunol . 1 5 4 ( 7 ) : 3 3 1 0 - 9 ( 1 9 9 5 ) 、及び Hawkins et al . , J . Mol . Biol . 2 2 6 : 8 8 9 - 8 9 6 ( 1 9 9 2 ) によって記載されている。

【 0 0 7 3 】

「ブロッキング」抗体または「アンタゴニスト」抗体は、それが結合する抗原の生物活

10

20

30

40

50

性を阻害するかまたは低下させる抗体である。特定のブロッキング抗体またはアンタゴニスト抗体は、抗原の生物活性を実質的にまたは完全に阻害する。

【0074】

本明細書で使用される「アゴニスト抗体」は、関心のポリペプチドの機能的活性の少なくとも1つを部分的にまたは完全に模倣する抗体である。

【0075】

「成長阻害性」抗体は、抗体が結合する抗原を発現する細胞の増殖を防止するかまたは低下させる抗体である。例えば、抗体は、Smoまたは突然変異体を発現する癌細胞の増殖をインピトロ及び/またはインピボで防止するかまたは低下させることができる。

【0076】

「アポトーシスを誘導する」抗体は、アネキシンVの結合、DNAの断片化、細胞の縮小、小胞体の拡張、細胞の断片化、及び/または膜小胞（アポトーシス小体と呼ばれる）の形成などの標準的なアポトーシスアッセイによって決定される、プログラム細胞死を誘導する抗体である。

10

【0077】

抗体「エフェクター機能」は、抗体のFc領域（ネイティブ配列Fc領域またはアミノ酸配列変異体Fc領域）に起因する生物活性を指し、抗体のアイソタイプによって異なる。抗体エフェクター機能の例には、C1q結合及び補体依存性細胞傷害（CDC）、Fc受容体結合、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）、貪食、細胞表面受容体（例えば、B細胞受容体）の下方調節、ならびにB細胞活性化が含まれる。

20

【0078】

本明細書中の「Fc領域」という用語は、ネイティブ配列Fc領域及び変異体Fc領域を含む、免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために使用される。免疫グロブリン重鎖のFc領域の境界は変動し得るが、ヒトIgG重鎖Fc領域は、通常、位置Cys226のアミノ酸残基から、またはPro230から、そのカルボキシル末端までのストレッチと定められている。Fc領域のC末端リジン（EU付番システムによる残基447）は、例えば、抗体の產生もしくは精製時に、または抗体の重鎖をコードする核酸を組換え操作することによって除去することができる。したがって、インタクト抗体の組成物は、全てのK447残基が除去された抗体集団、K447残基が除去されていない抗体集団、ならびにK447残基を有する抗体とK447残基を有さない抗体の混合物を有する抗体集団を含むことができる。

30

【0079】

「機能的Fc領域」は、ネイティブ配列Fc領域の「エフェクター機能」を保有する。例示的な「エフェクター機能」には、C1q結合、CDC、Fc受容体結合、ADCC、貪食、細胞表面受容体（例えば、B細胞受容体、BCR）の下方調節などが含まれる。そのようなエフェクター機能は、通常、Fc領域が結合ドメイン（例えば、抗体可変ドメイン）と組み合わされることを必要とし、例えば、本明細書中の定義に開示されている様々なアッセイを用いて評価することができる。

30

【0080】

「ネイティブ配列Fc領域」は、天然に見られるFc領域のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を含む。ネイティブ配列ヒトFc領域には、ネイティブ配列ヒトIgG1Fc領域（非A及びAアロタイプ）、ネイティブ配列ヒトIgG2Fc領域、ネイティブ配列ヒトIgG3Fc領域、及びネイティブ配列ヒトIgG4Fc領域、ならびに天然に存在するこれらの変異体が含まれる。

40

【0081】

「変異体Fc領域」は、少なくとも1つのアミノ酸の修飾、いくつかの実施形態では、1つ以上のアミノ酸の置換によってネイティブ配列Fc領域のものと異なるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、変異体Fc領域は、ネイティブ配列Fc領域または親ポリペプチドのFc領域と比べて、少なくとも1つのアミノ酸置換、例えば、ネイティブ配列Fc領域または親ポリペプチドのFc領域中の約1～約10個のアミノ酸置換、いく

50

つかの実施形態では、約1～約5個のアミノ酸置換を有する。本明細書中の変異体Fc領域は、いくつかの実施形態では、ネイティブ配列Fc領域との及び／または親ポリペプチドのFc領域との少なくとも約80%の相同性、またいくつかの実施形態では、それとの少なくとも約90%の相同性、またいくつかの実施形態では、それとの少なくとも約95%の相同性を保有する。

#### 【0082】

「Fc受容体」または「FcR」は、抗体のFc領域に結合する受容体を記載している。いくつかの実施形態では、FcRは、ネイティブなヒトFcRである。いくつかの実施形態では、FcRは、IgG抗体に結合するものであり（ガンマ受容体）、FcRI、FcRII、及びFcRIIIサブクラスの受容体を含み、それらの受容体の対立遺伝子変異体及び選択的にスプライシングされた形態が含まれる。FcRII受容体には、主にその細胞質ドメインが異なる類似のアミノ酸配列を有する、FcRIIA（「活性化受容体」）及びFcRIIB（「阻害性受容体」）が含まれる。活性化受容体FcRIIAは、その細胞質ドメイン中に免疫受容体チロシンに基づく活性化モチーフ（ITAM）を含む。活性化受容体FcRIIBは、その細胞質ドメイン中に免疫受容体チロシンに基づく阻害モチーフ（ITIM）を含む。（例えば、Daeron, Annu. Rev. Immunol., 12:433-455 (1994). 15:203-234 (1997)を参照）。FcRsは、例えば、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991)、Capel et al., Immunomethods 4:25-34 (1994)、及びde Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995)で総説されている。他のFcRは、将来同定されることになるものを含め、本明細書中の「FcR」という用語によって包含される。

#### 【0083】

「Fc受容体」または「FcR」という用語には、母親IgGの胎児への移動（Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976)、及びKim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)）、ならびに免疫グロブリンの恒常性の調節に関する、新生児受容体FcRnも含まれる。FcRnの結合を測定する方法は周知である（例えば、Ghetie and Ward., Immunol. Today 18 (12):592-598 (1997)、Ghetie et al., Nature Biotechnology, 15 (7):637-640 (1997)、Hinton et al., J. Biol. Chem. 279 (8):6213-6216 (2004)、WO 2004/92219 (Hinton et al.)を参照されたい）。

#### 【0084】

インビボでのヒトFcRnとの結合及びヒトFcRn高親和性結合ポリペプチドの血清半減期は、例えば、ヒトFcRnを発現するトランスジェニックマウスもしくはトランスフェクトされたヒト細胞株で、または変異体Fc領域を有するポリペプチドが投与された靈長類でアッセイすることができる。WO 2000/42072 (Presta)は、FcRとの結合が改善されたかまたは減少した抗体変異体を記載している。例えば、Shields et al. J. Biol. Chem. 9 (2):6591-6604 (2001)も参照されたい。

#### 【0085】

「ヒトエフェクター細胞」は、1つ以上のFcRを発現し、エフェクター機能を果たす白血球である。特定の実施形態では、細胞は、少なくともFcRIIIを発現し、ADCCエフェクター機能（複数可）を果たす。ADCCを媒介するヒト白血球の例には、末梢血単核細胞（PBMC）、ナチュラルキラー（NK）細胞、単球、細胞傷害性T細胞、及び好中球が含まれる。エフェクター細胞は、ネイティブな供給源から、例えば、血液から単離することができる。

#### 【0086】

10

20

30

40

50

「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害」または「A D C C」は、特定の細胞傷害性細胞（例えば、N K 細胞、好中球、及びマクロファージ）表面に存在するF c 受容体（F c R）上に結合した分泌されたI g が、これらの細胞傷害性エフェクター細胞が抗原を担持する標的細胞に特異的に結合し、その後、細胞毒素で標的細胞を死滅させることを可能にする、細胞傷害性の一形態を指す。A D C C を媒介する主要な細胞であるN K 細胞がF c R I I I のみを発現するのに対し、単球は、F c R I 、F c R I I 、及びF c R I I I を発現する。造血細胞上でのF c R の発現は、R a v e t c h and K i n e t , A n n u . R e v . I m m u n o l 9 : 4 5 7 - 9 2 ( 1 9 9 1 ) に要約されている。関心の分子のA D C C 活性を評価するために、米国特許第5,500,362号もしくは第5,821,337号または米国特許第6,737,056号（P r e s t a ）に記載されているものなどのインビトロA D C C アッセイを実施することができる。そのようなアッセイのための有用なエフェクター細胞には、P B M C 及びN K 細胞が含まれる。あるいは、またはさらに、関心の分子のA D C C 活性は、インビボで、例えば、C l y n e s et a l . P N A S ( U S A ) 9 5 : 6 5 2 - 6 5 6 ( 1 9 9 8 ) に開示されているものなどの動物モデルで評価することができる。

10

## 【0087】

「補体依存性細胞傷害」または「C D C」は、補体の存在下における標的細胞の溶解を指す。古典的補体経路の活性化は、補体系の第1成分（C 1 q ）と、その同族抗原に結合している（適切なサブクラスの）抗体との結合によって開始される。補体活性化を評価するために、例えば、G a z z a n o - S a n t o r o et a l . , J . I m m u n o l . M e t h o d s 2 0 2 : 1 6 3 ( 1 9 9 6 ) に記載されているようなC D C アッセイを実施することができる。変化したF c 領域アミノ酸配列を有するポリペプチド変異体（変異体F c 領域を有するポリペプチド）及び増大または減少したC 1 q 結合能力は、例えば、米国特許第6,194,551 B 1号及びWO 1999/51642に記載されている。例えば、I d u s o g i e et a l . J . I m m u n o l . 1 6 4 : 4 1 7 8 - 4 1 8 4 ( 2 0 0 0 ) も参照されたい。

20

## 【0088】

「F c 領域を含む抗体（F c r e g i o n - c o m p r i s i n g a n t i b o d y ）」という用語は、F c 領域を含む抗体を指す。F c 領域のC 末端リジン（E U付番システムによる残基447）は、例えば、抗体の精製時に、または抗体をコードする核酸の組換え操作によって除去することができる。したがって、本開示によるF c 領域を有する抗体を含む組成物は、K 447を有する抗体、全てのK 447が除去された抗体、またはK 447残基を有する抗体とK 447残基を有さない抗体の混合物を含むことができる。

30

## 【0089】

「結合親和性」は、通常、分子（例えば、抗体）の単一の結合部位とその結合パートナー（例えば、抗原）との間の非共有結合的相互作用の総和の強度を指す。特に示さない限り、本明細書で使用される「結合親和性」は、結合対のメンバー（例えば、抗体及び抗原）間の1:1の相互作用を反映する固有の結合親和性を指す。分子Xの、そのパートナーYに対する親和性は、通常、解離定数（K d ）によって表すことができる。親和性は、本明細書に記載の方法を含む、当技術分野で周知の一般的な方法によって測定することができる。低親和性抗体が、通常、抗原にゆっくりと結合し、容易に解離する傾向にあるのに対し、高親和性抗体は、通常、抗原により速く結合し、より長く結合したままである傾向にある。結合親和性を測定する種々の方法が当技術分野で周知であり、そのうちのいずれかを本開示の目的に使用することができる。結合親和性を測定するための具体的な説明的かつ例示的な実施形態を以下に記載する。

40

## 【0090】

一実施形態では、本開示による「K d 」または「K d 値」は、以下のアッセイによって記載されているように、関心の抗体のF a b 型及びその抗原を用いて実施される放射性標識抗原結合アッセイ（R I A ）によって測定される。抗原に対するF a b の溶液結合親和性は、一連の漸増量の未標識抗原の存在下で、最小濃度の（<sup>1</sup> <sup>2</sup> <sup>5</sup> I ）標識抗原でF a b

50

を平衡化し、その後、結合した抗原を抗 F a b 抗体がコーティングされたプレートで捕捉することによって測定される（例えば、Chen, et al., J. Mol. Biol. 293: 865 - 881 (1999) を参照されたい）。アッセイの条件を確立するために、MICRO TITER（登録商標）マルチウェルプレート（Thermo Scientific）を、50 mMの炭酸ナトリウム（pH 9.6）中の5 µg / mlの捕捉抗 F a b 抗体（Cappel Labs）で一晩コーティングし、その後、PBS中の2%（w / v）のウシ血清アルブミンで、室温（約23）で2~5時間ブロッキングする。非吸着プレート（Nunc # 269620）中で、100 pMまたは26 pMの [<sup>125</sup>I]-抗原を関心の F a b の連続希釈物と混合する（例えば、Presta et al., Cancer Res. 57: 4593 - 4599 (1997) の抗 VEGF 抗体、F a b - 12 の評価と一致）。その後、関心の F a b を一晩インキュベートする。しかしながら、平衡に達するのを保証するために、インキュベーションをより長い期間（例えば、約65時間）継続してもよい。その後、混合物を捕捉プレートに移して、室温でインキュベートする（例えば、1時間）。その後、溶液を除去し、プレートをPBS中の0.1%のTWEEN-20（商標）で8回洗浄する。プレートを乾燥させた後、150 µl / ウェルのシンチレーション剤（MICROSCINT-20（商標）、Packard）を添加し、プレートをTOPCOUNT（商標）ガンマカウンター（Packard）で10分間計数する。最大結合の20%以下を与える各々の F a b の濃度を、競合的結合アッセイでの使用のために選択する。

## 【0091】

別の実施形態によれば、KdまたはKd値は、BIACORE（登録商標）-2000またはBIACORE（登録商標）-3000（BIACore, Inc. Piscataway, NJ）を、25で、約10応答単位（RU）の固定された抗原CM5チップとともに使用する表面プラズモン共鳴アッセイを用いることによって測定される。簡潔に述べると、カルボキシメチル化したデキストランバイオセンサーチップ（CM5、BIACORE, Inc.）を、供給者の指示に従って、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩（EDC）及びN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）で活性化する。抗原を、10 mMの酢酸ナトリウム、pH 4.8で5 µg / ml（約0.2 µM）にまで希釈した後、5 µl / 分の流速で注入して、約10応答単位（RU）のカップリングされたタンパク質を達成する。抗原を注入した後、1 Mのエタノールアミンを注入して未反応の基をブロッキングする。反応速度の測定のために、F a b の2倍連続希釈物（0.78 nM~500 nM）を、25、約25 µl / 分の流速で、0.05%のTWEEN-20（商標）界面活性剤を含むPBS（PBS-T）中に注入する。会合速度（k<sub>on</sub>）及び解離速度（k<sub>off</sub>）は、単純な1対1ラングミュア結合モデル（BIACORE（登録商標）評価ソフトウェアバージョン3.2）を使用して、会合及び解離のセンサーグラムを同時に当てはめることによって計算される。平衡解離定数（Kd）は、k<sub>off</sub> / k<sub>on</sub>の比として計算される。例えば、Chen et al., J. Mol. Biol. 293: 865 - 881 (1999) を参照されたい。on速度が、上記の表面プラズモン共鳴アッセイによって106 M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>を超える場合、on速度は、ストップフローを備えたスペクトロフォーメーター（spectrophotometer）（Aviv Instruments）または攪拌キュベットを備えた8000シリーズのSLM-AMINCO（商標）分光光度計（Thermo Spectronic）などの分光計で測定されるような、漸増濃度の抗原の存在下における、PBS、pH 7.2中の20 nMの抗抗原抗体（F a b型）の25での蛍光放出強度の増加または減少を測定する蛍光クエンチング技術（励起 = 295 nm；放出 = 340 nm、16 nmの帯域通過）を使用することによって決定することができる。

## 【0092】

本発明による「on速度」、「会合の速度」、「会合速度」、または「k<sub>on</sub>」は、BIACORE（登録商標）-2000またはBIACORE（登録商標）-3000システム（BIACore, Inc. Piscataway, NJ）を使用して上記のように

10

20

30

40

50

決定することもできる。

【0093】

本明細書で使用される「実質的に類似する」または「実質的に同じ」という用語は、当業者によって、2つの値間の差異が、該値（例えば、Kd値）によって測定される生物学的特徴との関連において、生物学的及び／または統計的にほとんどまたは全く有意ではないものとみなされるような、2つの数値（例えば、一方は、本開示の抗体に関連するものであり、もう一方は、参照／比較抗体に関連するものである）間の十分に高い度合の類似度を示す。該2つの値間の差異は、例えば、参照／比較値の関数として約50%未満、約40%未満、約30%未満、約20%未満、及び／または約10%未満である。

【0094】

本明細書で使用される「実質的に低下した」または「実質的に異なる」という語句は、当業者によって、2つの値間の差異が、該値（例えば、Kd値）によって測定される生物学的特徴との関連において、統計的に有意であるものとみなされるような、2つの数値（通常、一方は、分子に関連するものであり、もう一方は、参照／比較分子に関連するものである）間の十分に高い度合の差異を示す。該2つの値間の差異は、例えば、参照／比較分子の値の関数として、約10%より大きい、約20%より大きい、約30%より大きい、約40%より大きい、及び／または約50%より大きい。

【0095】

「精製された」は、分子が、それが含まれる試料の少なくとも95重量%、または少なくとも98重量%の濃度で試料中に存在することを意味する。

【0096】

「単離された」核酸分子は、それが通常、例えば、その天然の環境中で関連している少なくとも1つの他の核酸分子から分離されている核酸分子である。単離された核酸分子には、通常は核酸分子を発現する細胞内に含まれているが、染色体外か、またはその天然の染色体位置とは異なる染色体の位置に存在する核酸分子がさらに含まれる。

【0097】

「単離された」タンパク質は、それが通常、例えば、その天然の環境中で関連している少なくとも1つの他の細胞成分から分離されているタンパク質である。いくつかの実施形態では、「単離された」タンパク質は、そのタンパク質が通常は発現されない細胞における発現されるタンパク質である。いくつかの実施形態では、単離されたタンパク質は組換えタンパク質である。

【0098】

本明細書で使用される「ベクター」という用語は、それが連結されている別の核酸を輸送することができる核酸分子を指すことが意図される。1つの種類のベクターは「プラスミド」であり、これは、その中に付加的なDNAセグメントをライゲーションし得る環状二本鎖DNAを指す。別の種類のベクターはファージベクターである。別の種類のベクターはウイルスベクターであり、この場合、付加的なDNAセグメントをウイルスゲノム中にライゲーションすることができる。ある特定のベクターは、それらが導入される宿主細胞内で自律複製することができる（例えば、細菌複製起点を有する細菌ベクター及びエピソーム哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター）は、宿主細胞内に導入されたときに宿主細胞のゲノム中に組み込まれることができ、その結果、宿主ゲノムとともに複製される。さらに、ある種のベクターは、それらが機能的に連結されている遺伝子の発現を導くことができる。そのようなベクターは、本明細書において、「組換え発現ベクター」、または単に「発現ベクター」と称される。一般に、組換えDNA技術において有用な発現ベクターは、プラスミドの形態であることが多い。プラスミドが最も一般的に使用されるベクターの形態であるため、本明細書において、「プラスミド」及び「ベクター」は互換的に使用されてもよい。

【0099】

本明細書で互換的に使用される「ポリヌクレオチド」または「核酸」は、任意の長さのヌクレオチドのポリマーを指し、DNA及びRNAを含む。いくつかの実施形態では、核

10

20

30

40

50

酸は、cDNA分子またはその断片である。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾されたヌクレオチドもしくは塩基、及び／またはそれらの類似体、あるいはDNAもしくはRNAポリメラーゼによるか、または合成反応によってポリマーに取り込ませることができる任意の基質であることができる。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチド及びその類似体などの修飾されたヌクレオチドを含み得る。存在する場合、ヌクレオチド構造に対する修飾は、ポリマーのアセンブリの前または後に与えてよい。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分によって中断されてもよい。ポリヌクレオチドは、標識とのコンジュゲーションなどの、合成後になされる修飾（複数可）を含み得る。他の修飾の種類には、例えば、「キャップ」、天然に存在するヌクレオチドのうちの1つまたは複数を類似体に置換すること、非荷電結合（例えば、ホスホン酸メチル、ホスホトリエステル、ホスホアミデート、カルバメートなど）を有するもの及び荷電結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を有するものなどのヌクレオチド間修飾、例えば、タンパク質（例えば、ヌクレアーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチド、ポリ（p1y）-L-リジンなど）などのペンドント部分を含有するもの、インターカレーター（例えば、アクリジン、ソラレンなど）を有するもの、キレート剤（例えば、金属、放射性金属、ホウ素、酸化金属など）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された連結を有するもの（例えば、アルファアノマー核酸など）、ならびにポリヌクレオチド（複数可）の非修飾形態が含まれる。さらに、糖の中に通常存在するヒドロキシル基のうちのいずれかを、例えば、ホスホン酸基、リン酸基によって置き換えるか、標準的な保護基によって保護するか、もしくはさらなるヌクレオチドとのさらなる連結を調製するために活性化することができるか、または固体もしくは半固体の支持体にコンジュゲートさせてもよい。5'及び3'末端のOHは、リン酸化するか、またはアミンもしくは1～20個の炭素原子の有機キャップ基部分で置換することができる。他のヒドロキシルを標準的な保護基へと誘導体化してもよい。ポリヌクレオチドは、例えば、2'-O-メチル-、2'-O-アリル-、2'-フルオロ-、または2'-アジド-リボース、炭素環式糖類似体、-アノマー糖、アラビノース、キシロース、またはリキソースなどのエピマー糖、ピラノース糖、フラノース糖、セドヘプツロース、非環状類似体、及びメチルリボシドなどの塩基性ヌクレオシド類似体を含む、当技術分野で一般に知られているリボースまたはデオキシリボース糖の類似形態を含有することもできる。1つ以上のリン酸ジエステル結合を代替の連結基によって置き換えるてもよい。これらの代替の連結基には、限定されないが、リン酸が、P(O)S（「チオエート」）、P(S)S（「ジチオエート」）、(O)NR<sub>2</sub>（「アミデート」）、P(OR)R、P(OR)OR'、CO、またはCH<sub>2</sub>（「ホルムアセタール」）によって置き換えられている実施形態が含まれ、式中、各RまたはR'は、独立して、H、またはエーテル（-O-）結合、アリール、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、もしくはアラルジルを任意に含有する置換もしくは非置換アルキル（1～20個のC）である。ポリヌクレオチド中の全ての連結が同一である必要はない。前述の説明は、RNA及びDNAを含む、本明細書で言及された全てのポリヌクレオチドに適用される。

#### 【0100】

本明細書で使用される「オリゴヌクレオチド」は、短い、通常は一本鎖の、通常は合成されたポリヌクレオチドを指し、これは、通常、長さが約200ヌクレオチド未満であるが、必ずしもそうである必要はない。「オリゴヌクレオチド」及び「ポリヌクレオチド」という用語は相互排他的ではない。ポリヌクレオチドの上記の説明は、オリゴヌクレオチドにも同等かつ完全に適用可能である。

#### 【0101】

本明細書で使用される「smo」または「SMO」または「スムースンド」という用語は、特に示されない限り、靈長類（例えば、ヒト）ならびに齧歯類（例えば、マウス及びラット）などの哺乳動物を含む、任意の脊椎動物供給源由来の任意のネイティブなスムースンドタンパク質または核酸を指す。この用語は、「完全長」の処理されていないSMO、及び細胞内での処理から生じる任意の形態のSMOを包含する。この用語は、SMOの

10

20

30

40

50

天然に存在する変異体、例えば、スプライシング変異体または対立遺伝子変異体も包含する。いくつかの実施形態では、本明細書で使用される「突然変異体 SMO」または「突然変異体 SMO ポリペプチド」または「突然変異体 SMO タンパク質」は、ヒト SMO の位置 241 で SMO の第 1 の膜貫通における突然変異を有する SMO、ヒト SMO の位置 281 で SMO の第 2 の膜貫通において突然変異を有する SMO、ヒト SMO の位置 408 で SMO の第 5 の膜貫通ドメインにおける突然変異を有する SMO、ヒト SMO の位置 459 または 469 で SMO の膜貫通ドメイン 6 における突然変異を有する SMO、及び / またはヒト SMO の位置 533 または 535 で SMO の膜貫通ドメイン 7 のカルボキシ末端部分における突然変異を有する SMO を指す。いくつかの実施形態では、本明細書で使用される「突然変異体 SMO」または「突然変異体 SMO ポリペプチド」または「突然変異体 SMO タンパク質」は、配列番号 1 の位置 241、281、408、412、459、469、533、及び / または 535 位置に対応する 1 つ以上のアミノ酸で突然変異を含むスムースンドポリペプチドを指す。いくつかの実施形態では、配列番号 1 の位置 241、281、408、412、459、469、533、及び / または 535 に対する 1 つ以上のアミノ酸での突然変異は、T241M、W281C、I408V、A459V、C469Y、S533N、及び / または W535L を含む。同様に、突然変異体 SMO タンパク質は、野生型ヒト SMO の前述の位置のうちのいずれか 1 つ以上で変形を有するとして説明される。本開示は、本明細書に記載の突然変異体ポリペプチドまたは核酸のいずれも、配列識別子に対して記載されるか、または野生型ヒト SMO に対して記載され得ることを企図している。さらに、突然変異体は、配列番号 1 に対して記載されるか、または他の配列識別子のうちのいずれかに対して記載され得る。

10

20

30

#### 【0102】

いくつかの実施形態では、本明細書で使用される場合、「治療」(及び「治療する」または「治療している」などの変化形)は、治療されている個体または細胞の自然経過を変化させる試みにおける臨床的介入を指し、予防のため、または臨床病理の経過中に行なうことができる。治療の望ましい効果には、疾患の発生または再発の予防、症状の軽減、疾患の任意の直接的または間接的な病理学的結果の減少、転移の予防、疾患の進行の速度の減少、病状の改善または緩和、及び寛解または予後の改善が含まれる。いくつかの実施形態では、本開示の抗体は、疾患もしくは障害の発症を遅延させるために、または疾患もしくは障害の進行を遅くするために使用される。いくつかの実施形態では、本明細書で使用する場合、「治療すること」または「治療」または「軽減」は、治療される状態の 1 つ以上の症状の重症度を改善、軽減、及び / または減少させることを指す。例として、癌を治療することは、癌の 1 つ以上の症状の進行または発症を改善(患者の状態を改善すること)、軽減、遅延、または減速させること、その重症度を減少させることを指す。例えば、癌を治療することは、腫瘍サイズの減少、腫瘍サイズ増大速度の減少、サイズ増大の停止、転移数の減少、疼痛の減少、生存期間の増加、及び無増悪生存期間の増加のうちのいずれか 1 つ以上を含む。

30

#### 【0103】

「治療すること」または「治療」または「軽減」は、治療される状態の 1 つ以上の症状の重症度を改善、軽減、及び / または減少させることを指す。例として、癌を治療することは、癌の 1 つ以上の症状の進行または発症を改善(患者の状態を改善すること)、軽減、遅延、または減速させること、その重症度を減少させることを指す。例えば、癌を治療することは、腫瘍サイズの減少、腫瘍サイズ増大速度の減少、サイズ増大の停止、転移数の減少、疼痛の減少、生存期間の増加、及び無増悪生存期間の増加のうちのいずれか 1 つ以上を含む。「診断すること」は、疾患または腫瘍の際立った特徴を同定または決定するプロセスを指す。癌の場合、診断プロセスは、重症度または疾患増悪に基づく病期判定または腫瘍分類として表されることもある。

40

#### 【0104】

「診断すること」は、疾患または腫瘍の際立った特徴を同定または決定するプロセスを指す。癌の場合、診断プロセスは、重症度または疾患増悪に基づく病期判定または腫瘍分

50

類として表されることもある。

【0105】

「個体」、「対象」、または「患者」は、ヒトなどの脊椎動物である。特定の実施形態では、脊椎動物は哺乳動物である。哺乳動物には、限定されないが、家畜（例えば、ウシ）、競技用動物、ペット（例えば、ネコ、イヌ、及びウマ）、靈長類、マウス、ならびにラットが含まれる。特定の実施形態では、哺乳動物はヒトである。

【0106】

「医薬製剤」という用語は、活性成分の生物活性が有効であることを可能にするような形態にあり、製剤が投与される対象に対して許容できないほど毒性があるさらなる成分を含有しない調製物を指す。そのような製剤は滅菌性であることができる。ある特定の実施形態では、医薬製剤は、発熱物質を含まない。

10

【0107】

「滅菌」製剤は、無菌性であるか、または全ての生きた微生物及びその胞子を含まない。「有効量」は、必要な投薬量で、かつ必要な期間、所望の治療的または予防的結果を達成するのに有効な量を指す。

【0108】

本開示の物質／分子の「治療有効量」は、個体の病状、年齢、性別、及び重量、ならびに個体において所望の応答を誘発する物質／分子の能力などの因子に応じて変動し得る。治療的有効量は、物質／分子の任意の毒性効果または有害効果を治療上有益な効果が上回る量を包含する。「予防有効量」は、必要な投薬量で、かつ必要な期間、所望の予防的結果を達成するのに有効な量を指す。通常、予防的用量は、疾患の前または疾患の初期段階の対象において使用されるため、予防的有効量は、治療的有効量よりも少なくなるが、必ずしもそうである必要はない。

20

【0109】

本明細書で使用される「細胞毒性剤」という用語は、細胞機能を阻害もしくは予防し、かつ／または細胞の死もしくは破壊を引き起こす物質を指す。この用語は、放射性同位体（例えば、 $\text{At}^{211}$ 、 $\text{I}^{131}$ 、 $\text{I}^{125}$ 、 $\text{Y}^{90}$ 、 $\text{Re}^{186}$ 、 $\text{Re}^{188}$ 、 $\text{Sm}^{153}$ 、 $\text{Bi}^{212}$ 、 $\text{P}^{32}$ 、 $\text{Pb}^{212}$ 、及び $\text{Lu}$ の放射性同位体）、化学療法剤（例えば、メトトレキサート、アドリアマイシン、ビンカアルカロイド（ビンクリスチン、ビンプラスチン、エトポシド）、ドキソルビシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシル、ダウノルビシン、または他のインターラート剤、核酸分解性酵素などの酵素及びその断片、抗生物質、細菌、真菌、植物、または動物起源の小分子毒素または酵素活性毒素などの毒素（その断片及び／または変異体を含む）、ならびに以下に開示する様々な抗腫瘍剤または抗癌剤を含むことが意図される。他の細胞毒性剤を以下に記載する。殺腫瘍剤は腫瘍細胞の破壊を引き起こす。

30

【0110】

「毒素」は、細胞の成長または増殖に対して有害な効果を有することができる任意の物質である。

【0111】

「化学療法剤」は、癌の治療において有用な化学物質である。化学療法剤の例には、チオテバ及びシクロスホスファミド（cyclophosphamide）（CYTOXAN（登録商標））などのアルキル化剤；ブスルファン、インプロスルファン、及びピポスルファンなどのアルキルスルホネート；ベンゾドーパ、カルボコン、メツレドーパ、及びウレドーパなどのアジリジン；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスホルアミド、及びトリメチロメラミンを含む、エチレンイミン及びメチラメラミン（methyleramine）；アセトゲニン（特に、プラタシン及びプラタシノン）；デルタ-9-テトラヒドロカンナビノール（ドロナビノール、MARIOL（登録商標））；ベータ-ラパコン；ラパコール；コルヒチン；ベツリン酸；カンプトテシン（合成類似体トポテカン（HYCAMTIN（登録商標））、CPT-11（イリノテカン、CAMPOTOSAR（登録商標））、アセチルカン

40

50

プトテシン、スコポレクチン (sco po lec t i n) 、及び 9 - アミノカンプトテシンを含む) ; ブリオスタチン ; カリスタチン ; CC - 1065 (そのアドゼレシン、カルゼレシン、及びビゼレシン合成類似体を含む) ; ポドフィロトキシン ; ポドフィリン酸 ; テニポシド ; クリプトフィシン (特に、クリプトフィシン 1 及びクリプトフィシン 8) ; ドラスタチン ; デュオカルマイシン (合成類似体 KW - 2189 及び CB1 - TM1 を含む) ; エロイテロピン ; パンクラチスタチン ; サルコジクチン ; スポンジスタチン ; クロラムブシル、クロルナファジン、クロロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベムビシン、フェネステリン、ブレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスターなどナイトロジエンマスター ; カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、及びラニムヌスチン (rani munus t i n e) などのニトロソ尿素 ; エネジイン抗生物質 (例えば、カリケアマイシン、特にカリケアマイシンガムマ 1 I 及びカリケアマイシンオメガ I 1 (例えば、Nicol a ou et al. , Angew. Chem. Int'l. Ed. Engl. , 33 : 183 - 186 (1994) を参照) ; CD P 323 、経口アルファ - 4 インテグリン阻害剤 ; ダイネミシン A を含むダイネミシン ; エスペラマイシン ; ならびにネオカルジノスタチン発色団及び関連する色素タンパク質エネジイン抗生物質発色団 ) 、アクラシノマイシン (a cl a c i n o my s i n) 、アクチノマイシン、オースラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、6 - ジアゾ - 5 - オキソ - L - ノルロイシン、ドキソルビシン (ADR I AM Y C I N (登録商標) ) 、モルホリノ - ドキソルビシン、シアノモルホリノ - ドキソルビシン、2 - ピロリノ - ドキソルビシン、ドキソルビシン HC1 リポソーム注射液 (DO X I L (登録商標) ) 、リポソームドキソルビシン TLC D - 99 (MYOCET (登録商標) ) 、ペグ化リポソームドキソルビシン (CAE LYX (登録商標) ) 、及びデオキシドキソルビシンを含む) 、エビルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトイマイシン C などのマイトイマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポルフィロマイシン、ピューロマイシン、クエラマイシン、ロドルビシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメックス、ジノスタチン、ゾルビシンなどの抗生物質 ; メトトレキサート、ゲムシタビン (GEMZAR (登録商標) ) 、テガフル (UFTORAL (登録商標) ) 、カペシタビン (XELODA (登録商標) ) 、エポチロン、及び 5 - フルオロウラシル (5 - FU) などの代謝拮抗物質 ; デノプテリン、メトトレキサート、ブテロブテリン、トリメトレキセートなどの葉酸類似体 ; フルダラビン、6 - メルカプトブリン、チアミブリン、チオグアニンなどのブリン類似体 ; アンシタビン、アザシチジン、6 - アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロキシウリジンなどのピリミジン類似体 ; カルステロン、プロピオニ酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトンなどのアンドロゲン ; アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンなどの抗副腎剤 ; フロリン酸などの葉酸リプレニッシャー ; アセグラトン ; アルドホスファミドグリコシド ; アミノレブリン酸 ; エニルウラシル ; アムサクリン ; ベストラブシル ; ビサントレン ; エダトラキセート ; デフォファミン ; デメコルシン ; ジアジコン ; エルフォルニチン (elfornithine) ; 酢酸エリブチニウム ; エポチロン ; エトグルシド ; 硝酸ガリウム ; ヒドロキシ尿素 ; レンチナン ; ロニダイニン ; メイタンシン及びアンサミトシンなどのメイタンシノイド ; ミトグアゾン ; ミトキサントロン ; モピダンモール ; ニトラエリン ; ペントスタチン ; フェナメット ; ピラルビシン ; ロソキサントロン ; 2 - エチルヒドラジド ; プロカルバジン ; PSK (登録商標) 多糖複合体 (JHS Natural Products, Eugene, OR) ; ラゾキサン ; リゾキシン ; シゾフィラン ; スピロゲルマニウム ; テヌアゾン酸 ; トリアジコン ; 2, 2', 2' - トリクロロトリエチルアミン ; トリコテセン (特に、T - 2 毒素、ベラクリン (verr acur i n) A 、ロリジン A 、及びアングイジン) ; ウレタン ; ビンデシン (ELDISINE (登録商標) ) 、FILEDESIN (登録 10  
20  
30  
40  
50

商標) ) ; ダカルバジン ; マンノムスチン ; ミトプロニトール ; ミトラクトール ; ピポブロマン ; ガシトシン ; アラビノシド (「Ara - C」) ; チオテパ ; タキソイド、例えば、パクリタキセル (TAXOL (登録商標)) 、パクリタキセルのアルブミン操作したナノ粒子製剤 (ABRAXANE (商標)) 、及びドセタキセル (TAXOTERE (登録商標)) ) ; クロランブシル (chlorambucil) ; 6 - チオグアニン ; メルカブトプリン ; メトトレキサート ; シスプラチン、オキサリプラチン (例えば、ELOXATIN (登録商標)) 、及びカルボプラチンなどの白金剤 ; ビンプラスチン (VELBAN (登録商標)) 、ビンクリスチン (ONCOVIN (登録商標)) 、ビンデシン (ELDISEINE (登録商標)) 、FILDESIN (登録商標)) 、及びビノレルビン (NAVELBINE (登録商標)) を含む、チューブリン重合が微小管を形成するのを妨げるビンカ ; エトボシド (VP - 16) ; イホスファミド ; ミトキサントロン ; ロイコボリン ; ノバントロン ; エダトレキサート ; ダウノマイシン ; アミノブテリン ; イバンドロネット ; トポイソメラーゼ阻害剤 RFS2000 ; ジフルオロメチルオルニチン (DMFO) ; ベキサロテン (TARGRETIN (登録商標)) を含むレチノイン酸などのレチノイド ; クロドロネット (例えば、BONEFOS (登録商標) またはOSTAC (登録商標)) 、エチドロネット (DIDROCAL (登録商標)) 、NE - 58095 、ゾレドロン酸 / ゾレドロネット (ZOMETA (登録商標)) 、アレンドロネット (FOSAMAX (登録商標)) 、パミドロネット (AREDIA (登録商標)) 、チルドロネット (SKELID (登録商標)) 、またはリセドロネット (ACTONEL (登録商標)) などのビスホスホネート ; トロキサシタビン (1,3 - ジオキソランスクレオシドシトシン類似体) ; アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に、例えば、PKC - アルファ、Raf、H - Ras 、及び表皮成長因子受容体 (EGF - R) などの、異常な細胞増殖に関係があるとされるシグナル伝達経路内の遺伝子の発現を阻害するもの ; THERATOPE (登録商標) ワクチンならびに遺伝子治療ワクチン、例えば、ALLOVECTIN (登録商標) ワクチン、LEUVECTIN (登録商標) ワクチン、及びVAXID (登録商標) ワクチンなどのワクチン ; トポイソメラーゼ1阻害剤 (例えば、LURTOTECAN (登録商標)) ; r m RH (例えば、ABARELIX (登録商標)) ; BAY 439006 (ソラフェニブ ; Bayer) ; SU - 11248 (スニチニブ、SUTENT (登録商標) 、Pfizer) ; ペリホシン、COX - 2阻害剤 (例えば、セレコキシブまたはエトリコキシブ) 、プロテオソーム阻害剤 (例えば、PS341) ; ボルテゾミブ (VELCADE (登録商標)) ; CCI - 779 ; チピファルニブ (R11577) ; オラフェニブ、ABT510 ; オブリメルセンナトリウム (GENASENSE (登録商標)) などのBc1 - 2阻害剤 ; ピクサントロン ; E G F R阻害剤 (以下の定義を参照) ; チロシンキナーゼ阻害剤 (以下の定義を参照) ; ラバマイシン (シロリムス、RAPAMUNE (登録商標)) などのセリン - トレオニンキナーゼ阻害剤 ; ロナファルニブ (SCH636、SARASAR (商標)) などのファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤 ; 及び上記のうちのいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体 ; ならびにシクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、及びプレドニゾロンの組み合せ療法の略記であるCHOP ; 及びオキサリプラチン (ELOXATIN (商標)) を5 - FU及びロイコボリンと組み合わせた治療レジメンの略記であるFOLFOXなどの、上記のうちの2つ以上の組み合せが含まれる。

## 【0112】

本明細書で定義される化学療法剤には、癌の成長を促進することができるホルモンの効果を調節するか、低下させるか、遮断するか、または阻害するように作用する「抗ホルモン剤」または「内分泌治療剤」が含まれる。それらは、限定されないが：タモキシフェン (NOLVADEX (登録商標)) 、4 - ヒドロキシタモキシフェン、トレミフェン (FARESTON (登録商標)) 、イドキシフェン、ドロキシフェン、ラロキシフェン (EVISTA (登録商標)) 、トリオキシフェン、ケオキシフェン、及びSERM3などの選択的エストロゲン受容体モジュレーター (SERM) を含む、混合アゴニスト / アンタゴニストプロファイルを有する抗エストロゲン ; フルベストラント (FASLODEX

10

20

30

40

50

(登録商標) ) 及び E M 8 0 0 などの、アゴニスト特性を有さない純粋な抗エストロゲン (そのような薬剤は、エストロゲン受容体 (E R ) の二量体化を遮断し、D N A 結合を阻害し、E R の代謝回転を増加させ、かつ / または E R レベルを抑制し得る) ; フォルメスタン及びエキセメスタン ( A R O M A S I N (登録商標) ) などのステロイド性アロマターゼ阻害剤、ならびにアナストラゾール ( A R I M I D E X (登録商標) ) 、レトロゾール ( F E M A R A (登録商標) ) 、及びアミノグルテチミドなどの非ステロイド性アロマターゼ阻害剤を含む、アロマターゼ阻害剤であり、他のアロマターゼ阻害剤にはボロゾール ( R I V I S O R (登録商標) ) 、酢酸メゲストロール ( M E G A S E (登録商標) ) 、ファドロゾール、及び 4 ( 5 ) - イミダゾールが含まれる ; ロイプロリド ( L U P R O N (登録商標) 及び E L I G A R D (登録商標) ) 、ゴセレリン、ブセレリン、ならびにトリプテレリン ( t r i p t e r e l i n ) を含む、黄体形成ホルモン放出ホルモンアゴニスト；酢酸メゲストロール及び酢酸メドロキシプロゲステロンなどのプロゲスチン、ジエチルスチルベストロール及びプレマリンなどのエストロゲン、ならびにフルオキシメステロン、全てのトランスレチオニン酸 ( t r a n s r e t i o n i c a c i d ) 及びフェンレチニドなどのアンドロゲン / レチノイドを含む、性ステロイド；オナブリストン；抗プロゲステロン；エストロゲン受容体下方調節物質 ( E R D ) ；フルタミド、ニルタミド、及びビカルタミドなどの抗アンドロゲン；上記のうちのいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体；ならびに上記のうちの 2 つ以上の組み合せを含む、ホルモン 자체であってもよい。

10

20

30

40

## 【 0 1 1 3 】

本明細書で使用される場合の「成長阻害性薬剤」は、細胞 ( 例えは、S M O を発現する細胞 ) の成長をインビトロまたはインビボのどちらかで阻害する化合物または組成物を指す。したがって、成長阻害性薬剤は、S 期の細胞 ( 例えは、S M O を発現する細胞 ) パーセンテージを有意に低下させる物であり得る。成長阻害性薬剤の例には、G 1 停止及びM 期停止を誘導する薬剤などの、細胞周期の進行を ( S 期以外の時点で ) 遮断する薬剤が含まれる。古典的なM 期遮断剤には、ビンカ ( ビンクリスチン及びビンプラスチン ) 、タキサン、ならびにドキソルビシン、エピルビシン、ダウノルビシン、エトポシド、及びブレオマイシンなどのトポイソメラーゼ I I 阻害剤が含まれる。G 1 を停止させる薬剤は、S 期停止にも波及し、例えは、タモキシフェン、プレドニゾン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチニン、メトトレキサート、5 - フルオロウラシル、及び a r a - C などのD N A アルキル化剤がある。さらなる情報は、M e n d e l s o h n a n d I s r a e l , e d s . , T h e M o l e c u l a r B a s i s o f C a n c e r , C h a p t e r 1 , e n t i t l e d " C e l l c y c l e r e g u l a t i o n , o n c o g e n e s , a n d a n t i n e o p l a s t i c d r u g s " b y M u r a k a m i e t a l . ( W . B . S a u n d e r s , P h i l a d e l p h i a , 1 9 9 5 ) 、例えは、1 3 ページに見出すことができる。タキサン ( パクリタキセル及びドセタキセル ) は、どちらもイチイに由来する抗癌薬である。ヨーロッパイチイに由来するドセタキセル ( T A X O T E R E (登録商標) , R h o n e - P o u l e n c R o r e r ) は、パクリタキセル ( T A X O L (登録商標) , B r i s t o l - M y e r s S q u i b b ) の半合成類似体である。パクリタキセル及びドセタキセルは、チューブリン二量体からの微小管のアセンブリを促進し、脱重合を防止することによって微小管を安定化し、細胞内の有糸分裂の阻害をもたらす。

## 【 0 1 1 4 】

「突然変異体 S M O アンタゴニスト」は、ヒト S M O の位置 2 4 1 、 2 8 1 、 4 0 8 、 4 5 9 、 4 6 9 、 5 3 3 、または 5 3 5 でアミノ酸置換を有する、S M O の生物活性を阻害する化合物であり、このアミノ酸置換は、この位置の野生型アミノ酸を任意の他のアミノ酸へと変化させる。いくつかの実施形態では、S M O の生物活性は、ヘッジホッグで刺激したときにシグナルを G 1 i 転写因子の活性化へと伝達する能力である。

## 【 0 1 1 5 】

本明細書で使用される「ヘッジホッグ経路阻害剤」という用語は、細胞におけるヘッジ

50

ホッギングナル伝達を阻害することができる薬剤を指すことが意図される。特定の実施形態では、ヘッジホッギングアンタゴニストは、本明細書に記載の突然変異体 S M O タンパク質のうちのいずれかを発現する細胞においてヘッジホッギングナル伝達を阻害することができる。いくつかの実施形態では、ヘッジホッギング経路阻害剤は、配列番号 1 の 2 4 1 、 2 8 1 、 4 0 8 、 4 5 9 、 4 6 9 、 5 3 3 、または 5 3 5 に対応する 1 つ以上のアミノ酸で（例えば、野生型ヒト S M O における対応する位置に）突然変異を含むスムースンドポリペプチドを発現する細胞においてヘッジホッギングナル伝達を阻害することができる。いくつかの実施形態では、ヘッジホッギング経路阻害剤は、以下の突然変異のいずれかを含むスムースンドポリペプチドを発現する細胞においてヘッジホッギングナル伝達を阻害することができる： T 2 4 1 M 、 W 2 8 1 C 、 I 4 0 8 V 、 A 4 5 9 V 、 C 4 6 9 Y 、 S 5 3 3 N 、及び／または W 5 3 5 L 。

10

## 【 0 1 1 6 】

## I . 核酸

本発明の核酸には、単離された突然変異体 S M O をコードする配列が含まれる。いくつかの実施形態では、核酸は、ビスマデギブに対して部分的または完全に耐性である突然変異体 S M O タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、核酸は、ヘッジホッギングナル伝達経路においてタンパク質をコードする遺伝子にさらなる突然変異を有する細胞においてビスマデギブに対して部分的または完全に耐性である突然変異体 S M O タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、さらなる突然変異は、本明細書に記載の p a t c h e d 及び／または S U F U 突然変異のうちのいずれかである。

20

## 【 0 1 1 7 】

いくつかの実施形態では、本開示は、突然変異体 S M O タンパク質をコードする単離された核酸分子を提供し、該アミノ酸配列は、野生型 S M O アミノ酸配列の位置 2 3 9 に対応するアミノ酸位置でアラニン以外のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号 5 の核酸配列と少なくとも 8 0 % 、 8 5 % 、 8 6 % 、 8 7 % 、 8 8 % 、 8 9 % 、 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、または 1 0 0 % 同一であり、核酸が配列番号 1 の位置 2 3 9 に対応するアミノ酸位置でアラニン（ A ）以外のアミノ酸を含む S M O ポリペプチドをコードするように、少なくとも 1 つの突然変異を含む、配列を含む。いくつかの実施形態では、そのような核酸は、配列番号 1 の位置 2 3 9 に対応するアミノ酸位置でバリン（ V ）をコードする。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号 5 の位置 7 1 5 、 7 1 6 、及び／または 7 1 7 に対応するヌクレオチド位置で親野生型 S M O からの少なくとも 1 つの突然変異を有する。いくつかの実施形態では、配列番号 5 との同一性パーセントは、 8 5 % 、 8 6 % 、 8 7 % 、 8 8 % 、 8 9 % 、 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、または 1 0 0 % であるが、但し、配列番号 5 の位置 7 1 5 、 7 1 6 、及び／または 7 1 7 に対応するヌクレオチド位置に少なくとも 1 つの突然変異が存在する。いくつかの実施形態では、本開示は、突然変異体 S M O タンパク質をコードする単離された核酸分子を提供し、該アミノ酸配列は、野生型 S M O アミノ酸配列の位置 2 4 1 に対応するアミノ酸位置でトレオニン以外のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号 5 の核酸配列と少なくとも 8 0 % 、 8 5 % 、 8 6 % 、 8 7 % 、 8 8 % 、 8 9 % 、 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、または 1 0 0 % 同一であり、核酸が配列番号 1 の位置 2 4 1 に対応するアミノ酸位置でトレオニン（ T ）以外のアミノ酸を含む S M O ポリペプチドをコードするように、少なくとも 1 つの突然変異を含む、配列を含む。いくつかの実施形態では、そのような核酸は、配列番号 1 の位置 2 4 1 に対応するアミノ酸位置でメチオニン（ M ）をコードする。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号 5 の位置 7 2 1 、 7 2 2 、及び／または 7 2 3 に対応するヌクレオチド位置で親野生型 S M O からの少なくとも 1 つの突然変異を有する。いくつかの実施形態では、配列番号 5 との同一性パーセントは、 8 5 % 、 8 6 % 、 8 7 % 、 8 8 % 、 8 9 % 、 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、または 1 0 0 % であるが、但し、配列番号 5 の位置 7 2 1 、 7 2 2 、及び／または 7 2 3 に対応するヌクレオチド位置で親野生型 S M O からの少なくとも 1 つの突然変異を有する。

30

いくつかの実施形態では、配列番号 5 との同一性パーセントは、 8 5 % 、 8 6 % 、 8 7 % 、 8 8 % 、 8 9 % 、 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、または 1 0 0 % であるが、但し、配列番号 5 の位置 7 2 1 、 7 2 2 、及び／または 7 2 3 に対応するヌクレオチド位置で親野生型 S M O からの少なくとも 1 つの突然変異を有する。いくつかの実施形態では、配列番号 5 との同一性パーセントは、 8 5 % 、 8 6 % 、 8 7 % 、 8 8 % 、 8 9 % 、 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、または 1 0 0 % であるが、但し、配列番号 5 の位置 7 2 1 、 7 2 2 、及び／または 7 2 3 に対応するヌクレオチド位置で親野生型 S M O からの少なくとも 1 つの突然変異を有する。いくつかの実施形態では、配列番号 5 との同一性パーセントは、 8 5 % 、 8 6 % 、 8 7 % 、 8 8 % 、 8 9 % 、 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、または 1 0 0 % であるが、但し、配列番号 5 の位置 7 2 1 、 7 2 2 、及び／または 7 2 3 に対応するヌクレオチド位置で親野生型 S M O からの少なくとも 1 つの突然変異を有する。

40

いくつかの実施形態では、配列番号 5 との同一性パーセントは、 8 5 % 、 8 6 % 、 8 7 % 、 8 8 % 、 8 9 % 、 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、または 1 0 0 % であるが、但し、配列番号 5 の位置 7 2 1 、 7 2 2 、及び／または 7 2 3 に対応するヌクレオチド位置で親野生型 S M O からの少なくとも 1 つの突然変異を有する。いくつかの実施形態では、配列番号 5 との同一性パーセントは、 8 5 % 、 8 6 % 、 8 7 % 、 8 8 % 、 8 9 % 、 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、または 1 0 0 % であるが、但し、配列番号 5 の位置 7 2 1 、 7 2 2 、及び／または 7 2 3 に対応するヌクレオチド位置で親野生型 S M O からの少なくとも 1 つの突然変異を有する。

50

/または723に対応するヌクレオチド位置に少なくとも1つの突然変異が存在する。いくつかの実施形態では、本開示は、突然変異体SMOタンパク質をコードする単離された核酸分子を提供し、該アミノ酸配列は、野生型SMOアミノ酸配列の位置281に対応するアミノ酸位置でトリプトファン以外のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号5の核酸配列と少なくとも80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であり、核酸が配列番号1の位置281に対応するヌクレオチド位置でトリプトファン(W)以外のアミノ酸を含むSMOポリペプチドをコードするよう10に、少なくとも1つの突然変異を含む、配列を含む。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号1の位置281に対応するアミノ酸位置でシステイン(C)をコードする。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号5のヌクレオチド位置841、842、及び/または843に対応するヌクレオチド位置で親野生型SMOからの少なくとも1つの突然変異を有する。いくつかの実施形態では、配列番号5との同一性パーセントは、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であるが、但し、配列番号5の位置841、842、及び/または843に対応するヌクレオチド位置に少なくとも1つの突然変異が存在する。いくつかの実施形態では、本開示は、突然変異体SMOタンパク質をコードする単離された核酸分子を提供し、該アミノ酸配列は、野生型SMOアミノ酸配列の位置408に対応するアミノ酸位置でイソロイシン以外のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号5の核酸配列と少なくとも80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であり、核酸が配列番号1の位置408に対応するアミノ酸位置でイソロイシン(I)以外のアミノ酸を含むSMOポリペプチドをコードするよう20に、少なくとも1つの突然変異を含む、配列を含む。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号1の位置408に対応するアミノ酸位置でバリン(V)をコードする。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号5の位置1222、1223、及び/または1224に対応するヌクレオチド位置で親野生型SMOからの少なくとも1つの突然変異を有する。いくつかの実施形態では、配列番号5との同一性パーセントは、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であるが、但し、配列番号5の位置1222、1223、及び/または1224に対応するヌクレオチド位置に少なくとも1つの突然変異が存在する。いくつかの実施形態では、本開示は、突然変異体SMOタンパク質をコードする単離された核酸分子を提供し、該アミノ酸配列は、野生型SMOアミノ酸配列の位置459に対応するアミノ酸位置でアラニン以外のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号5の核酸配列と少なくとも80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であり、核酸が配列番号1の位置459に対応するアミノ酸位置でアラニン(A)以外のアミノ酸を含むSMOポリペプチドをコードするよう30に、少なくとも1つの突然変異を含む、配列を含む。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号1の位置459に対応するアミノ酸位置でバリン(V)をコードする。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号5の位置1375、1376、及び/または1377に対応するヌクレオチド位置で親野生型SMOからの少なくとも1つの突然変異を有する。いくつかの実施形態では、配列番号5との同一性パーセントは、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であるが、但し、配列番号5の位置1375、1376、及び/または1377に対応するヌクレオチド位置に少なくとも1つの突然変異が存在する。いくつかの実施形態では、本開示は、突然変異体SMOタンパク質をコードする単離された核酸分子を提供し、該アミノ酸配列は、野生型SMOアミノ酸配列の位置469に対応するアミノ酸位置でシステイン以外のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号5の核酸配列と少なくとも80%、85%、86%、87%、40

88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であり、核酸が配列番号1の位置469に対応するアミノ酸位置でシステイン(C)以外のアミノ酸を含むSMOポリペプチドをコードするように、少なくとも1つの突然変異を含む、配列を含む。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号1の位置469に対応するアミノ酸位置でチロシン(Y)をコードする。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号5の位置1405、1406、及び/または1407に対応するヌクレオチド位置で親野生型SMOからの少なくとも1つの突然変異を有する。いくつかの実施形態では、配列番号5との同一性パーセントは、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であるが、但し、配列番号5の位置1405、1406、及び/または1407に対応するヌクレオチド位置に少なくとも1つの突然変異が存在する。いくつかの実施形態では、本開示は、突然変異体SMOタンパク質をコードする単離された核酸分子を提供し、該アミノ酸配列は、野生型SMOアミノ酸配列の位置533に対応するアミノ酸位置でセリン以外のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号5の核酸配列と少なくとも80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であり、核酸が配列番号1の位置533に対応するアミノ酸位置でセリン(S)以外のアミノ酸を含むSMOポリペプチドをコードするように、少なくとも1つの突然変異を含む、配列を含む。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号1の位置533に対応するアミノ酸位置でアスパラギン(N)をコードする。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号5の位置1597、1598、及び/または1599に対応するヌクレオチド位置で親野生型SMOからの少なくとも1つの突然変異を有する。いくつかの実施形態では、配列番号5との同一性パーセントは、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であるが、但し、配列番号5の位置1597、1598、及び/または1599に対応するヌクレオチド位置に少なくとも1つの突然変異が存在する。いくつかの実施形態では、本開示は、突然変異体SMOタンパク質をコードする単離された核酸分子を提供し、該アミノ酸配列は、野生型SMOアミノ酸配列の位置535に対応するアミノ酸位置でトリプトファン以外のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号5の核酸配列と少なくとも80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であり、核酸が配列番号1の位置535に対応するアミノ酸位置でトリプトファン(W)以外のアミノ酸を含むSMOポリペプチドをコードするように、少なくとも1つの突然変異を含む、配列を含む。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号1のアミノ酸位置535に対応するヌクレオチド位置でロイシン(L)をコードする。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号5の位置1603、1604、及び/または1605に対応するヌクレオチド位置で親野生型SMOからの少なくとも1つの突然変異を有する。いくつかの実施形態では、配列番号5との同一性パーセントは、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であるが、但し、配列番号5のヌクレオチド位置1603、1604、及び/または1605に対応するヌクレオチド位置に少なくとも1つの突然変異が存在する。いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号5の核酸配列と少なくとも80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であり、核酸が表4に示すアミノ酸変化のうちのいずれか1つ以上を含むSMOポリペプチドをコードするように、少なくとも1つの突然変異を含む、配列を含む(実施例6を参照)。

#### 【0118】

本開示はまた、長さが少なくとも20ヌクレオチドである断片中の、上記の突然変異の領域にまたがるほどの核酸の断片も企図している。いくつかの実施形態では、ヌクレオチ

10

20

30

40

50

ド断片は、長さが 25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または 100 ヌクレオチドである。断片は、上記の突然変異の領域から完全長の突然変異体 SMO をコードする核酸分子にまで及ぶ任意の長さであり得る。単離された突然変異体 SMO 及びその断片は、例えば、ハイブリダイゼーションのために、本開示の予後判定アッセイ及び診断アッセイのためのプライマー及びプローブを生成するために、ならびに組換え系での発現のために（例えば、免疫原として使用するための及び本明細書に記載の本開示のアッセイで使用するための突然変異体 SMO タンパク質またはその一部を生成するために）使用することができる。

## 【0119】

本開示は、本開示の方法において突然変異体 SMO 核酸分子を同定するために使用し得る核酸プローブを提供する。突然変異体 SMO を有することが疑われる組織または SMO の状態が未知である組織に由来する核酸試料を、突然変異体 SMO に対する特異的プローブを用いて、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1989) に記載されているものなどの標準的な手順を用いてスクリーニングすることができる。あるいは、SMO をコードする核酸を組織から増幅し、本開示の特異的プローブでプローピングして、突然変異体 SMO の不在または存在を決定することができる。PCR 法は当技術分野で周知である（前出の Sambrook ら、Dieffenbach et al., PCR Primer: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1995）。

10

20

## 【0120】

突然変異体 SMO をコードするヌクレオチド配列（またはその相補配列）は、ハイブリダイゼーションプローブとしての使用、ならびにアンチセンス RNA 及び DNA プローブの作製における使用を含む、分子生物学の分野における様々な用途を有する。突然変異体 SMO をコードする核酸は、本明細書に記載の組換え技術による突然変異体 SMO ポリペプチドの調製にも有用であり、この場合、これらの突然変異体 SMO ポリペプチドは、例えば、本明細書に記載の抗突然変異体 SMO 抗体の調製において用途を見出し得る。

## 【0121】

完全長の突然変異体 SMO 核酸、またはその部分は、突然変異体 SMO を同定するためのハイブリダイゼーションプローブとして使用してもよい。

30

## 【0122】

任意に、プローブの長さは約 20 ~ 約 50 塩基である。ハイブリダイゼーションプローブは、完全長の突然変異体 SMO ヌクレオチド配列の少なくとも突然変異領域に由来し得る。

## 【0123】

例として、スクリーニング方法は、約 40 塩基の選択されたプローブを合成するために、既知の DNA 配列を使用して突然変異体 SMO のコード領域を単離することを含む。ハイブリダイゼーションプローブは、<sup>32</sup>P もしくは <sup>35</sup>S などの放射性ヌクレオチド、またはアビジン / ビオチン結合系を介してプローブに結合されたアルカリホスファターゼなどの酵素標識を含む、種々の標識によって標識し得る。本開示の突然変異体 SMO 遺伝子の配列に相補的な配列を有する標識プローブを使用して、ヒト cDNA、ゲノム DNA、または mRNA のライブラリーをスクリーニングし、そのようなライブラリーのどのメンバーにプローブがハイブリダイズするかを決定することができる。ハイブリダイゼーション産物はポリアクリルアミドゲル上で分離することができる。さらに、SMO 突然変異は、実施例に記載の方法を使用して決定することができる。中等度のストリングエンシー及び高いストリングエンシーを含むハイブリダイゼーション条件は、前出の Sambrook らに提供されている。

40

## 【0124】

そのようなライブラリースクリーニング方法で同定された配列は、SMO 及び突然変異

50

体 S M O の既知の配列と比較し、整列させることができる。第 1、第 2、第 5、第 6、もしくは第 7 の膜貫通ドメインでの、膜貫通ドメイン 6 のカルボキシ末端領域での、または膜貫通ドメイン 7 のカルボキシ末端領域での配列同一性は、当技術分野で周知の方法を使用して決定することができる。

【 0 1 2 5 】

S M O をコードする核酸の他の有用な断片には、標的突然変異体 S M O m R N A (センス) または突然変異体 S M O D N A (アンチセンス) 配列に結合することができる一本鎖核酸配列 (R N A または D N A のいずれか) を含むアンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドが含まれる。本開示によるアンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドは、突然変異領域を含む突然変異体 S M O D N A のコード領域の断片を含む。そのような断片は、通常、少なくとも約 14 個のヌクレオチド、いくつかの実施形態では、約 14 ~ 30 個のヌクレオチドを含む。所与のタンパク質をコードする c D N A 配列に基づいて、アンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドを得る能力は、例えば、Stein and Cohen (1988) Cancer Res. 48: 2659、及び van der Krol et al. (1988) Biotechniques 6: 958 に記載されている。

10

【 0 1 2 6 】

いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書に記載の突然変異体 S M O 核酸のうちのいずれかの発現を阻害することができる核酸を提供する。アンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドと標的核酸配列との結合は、二重鎖の分解の増強、転写もしくは翻訳の早期終結を含むいくつかの手段のうちの 1 つによるか、または他の手段による、標的配列の転写または翻訳を遮断する二重鎖の形成をもたらす。そのような方法は本発明によって包含されている。したがって、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて突然変異体 S M O タンパク質の発現を遮断することができ、これらの突然変異体 S M O タンパク質は、G D C - 0 4 4 9 などの化学療法剤に対する哺乳動物内の癌の耐性において役割を果たすことができる。アンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドは、修飾された糖 - ホスホジエステル骨格 (または W O 9 1 / 0 6 6 2 9 に記載されているものなどの他の糖連結) を有し、かつそのような糖連結が、内在性ヌクレアーゼに対して耐性であるオリゴヌクレオチドをさらに含む。耐性のある糖連結を有するそのようなオリゴヌクレオチドは、インビボで安定である (すなわち、酵素分解に抵抗することができる) が、標的ヌクレオチド配列に結合するための配列特異性を保持している。

20

【 0 1 2 7 】

突然変異体 S M O タンパク質の発現を阻害するのに有用なアンチセンス化合物の具体的な例には、修飾骨格または非天然のヌクレオシド間連結を含むオリゴヌクレオチドが含まれる。修飾骨格を有するオリゴヌクレオチドには、骨格中にリン原子を保持しているもの及び骨格中にリン原子を有さないものが含まれる。本明細書の目的のために、かつ当技術分野において時折言及されるように、そのヌクレオシド間骨格中にリン原子を有さない修飾オリゴヌクレオチドもオリゴヌクレオシドであるとみなすことができる。いくつかの実施形態では、修飾オリゴヌクレオチド骨格には、例えば、ホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリ - エステル、3' - アルキレンホスホネート、5' - アルキレンホスホネート、及びキラルホスホネートを含む、メチル及び他のアルキルホスホネート、ホスフィネート、3' - アミノホスホロアミデート、及びアミノアルキルホスホロアミデートを含む、ホスホアミデート (phosphoramidate)、チオノホスホロアミデート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、セレノホスホネート、ならびに通常の 3' - 5' 連結を有するボラノ - ホスホネート、これらの 2' - 5' 連結類似体、及び 1 つ以上のヌクレオチド間連結が 3' から 3'、5' から 5'、または 2' から 2' への連結である、逆転した極性を有するものが含まれる。いくつかの実施形態では、逆転した極性を有するオリゴヌクレオチドは、最も 3' 側のヌクレオチド間連結で単一の 3' から 3' への連結、すなわち、脱塩基 (核酸塩基が欠失しているか、またはその代わ

30

40

50

りにヒドロキシル基を有する)であり得る单一の逆転したヌクレオシド残基を含む。様々な塩、混合塩、及び遊離酸の形態も含まれる。リン含有連結の調製を教示している代表的な米国特許には、限定されないが、米国特許第3,687,808号、第4,469,863号、第4,476,301号、第5,023,243号、第5,177,196号、第5,188,897号、第5,264,423号、第5,276,019号、第5,278,302号、第5,286,717号、第5,321,131号、第5,399,676号、第5,405,939号、第5,453,496号、第5,455,233号、第5,466,677号、第5,476,925号、第5,519,126号、第5,536,821号、第5,541,306号、第5,550,111号、第5,563,253号、第5,571,799号、第5,587,361号、第5,194,599号、第5,565,555号、第5,527,899号、第5,721,218号、第5,672,697号、及び第5,625,050号が含まれ、これらは各々、参照により本明細書に組み込まれる。

### 【0128】

いくつかの実施形態では、核酸は、修飾ヌクレオチドまたは修飾オリゴヌクレオチド骨格を含む。いくつかの実施形態では、中にリン原子を含まない修飾オリゴヌクレオチド骨格は、短鎖アルキルもしくはシクロアルキルヌクレオシド間連結、混合ヘテロ原子及びアルキルもしくはシクロアルキルヌクレオシド間連結、または1つ以上の短鎖ヘテロ原子もしくは複素環式ヌクレオシド間連結によって形成される骨格を有する。これらには、モルホリノ連結(ヌクレオシドの糖部分から一部形成される)；シロキサン骨格；スルフィド、スルホキシド、及びスルホン骨格；ホルムアセチル及びチオホルムアセチル骨格；メチレンホルムアセチル及びチオホルムアセチル骨格；リボアセチル骨格；アルケン含有骨格；スルファメート骨格；メチレンイミノ及びメチレンヒドラジノ骨格；スルホネート及びスルホンアミド骨格；アミド骨格を有するもの；ならびに混合されたN、O、S、及びCH<sub>2</sub>成分部分を有する他のものが含まれる。そのようなオリゴヌクレオシドの調製を教示している代表的な米国特許には、限定されないが、米国特許第5,034,506号、第5,166,315号、第5,185,444号、第5,214,134号、第5,216,141号、第5,235,033号、第5,264,562号、第5,264,564号、第5,405,938号、第5,434,257号、第5,466,677号、第5,470,967号、第5,489,677号、第5,541,307号、第5,561,225号、第5,596,086号、第5,602,240号、第5,610,289号、第5,618,704号、第5,623,070号、第5,663,312号、第5,633,360号、第5,677,437号、第5,792,608号、第5,646,269号、及び第5,677,439号が含まれ、これらは各々、参照により本明細書に組み込まれる。

### 【0129】

アンチセンスオリゴヌクレオチドのいくつかの実施形態では、他の好ましいアンチセンスオリゴヌクレオチドでは、ヌクレオチド単位の糖とヌクレオシド間連結、すなわち、骨格とが両方とも、新規の基で置き換えられている。塩基単位は、適切な核酸標的化合物とのハイブリダイゼーションのために維持されている。1つのそのようなオリゴマー化合物、優れたハイブリダイゼーション特性を有することが示されているオリゴヌクレオチド模倣体は、ペプチド核酸(PNA)と呼ばれる。PNA化合物では、オリゴヌクレオチドの糖骨格は、アミド含有骨格、特に、アミノエチルグリシン骨格で置き換えられている。核酸塩基は保持されており、骨格のアミド部分のアザ窒素原子と直接的または間接的に結合している。PNA化合物の調製を教示している代表的な米国特許には、限定されないが、米国特許第5,539,082号、第5,714,331号、及び第5,719,262号が含まれ、これらは各々、参照により本明細書に組み込まれる。PNA化合物のさらなる教示は、Nielsen et al. (1991) Science 254:1497-1500に見出すことができる。

10

20

30

40

50

## 【0130】

いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、上で言及した米国特許第5,489,677号に記載のホスホロチオエート骨格及び/またはヘテロ原子骨格、特に、-CH<sub>2</sub>-NH-O-CH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-O-CH<sub>2</sub>- (メチレン(メチルイミノ)またはMMI骨格として知られる)、-CH<sub>2</sub>-O-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-、及び-O-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- (天然のホスホジエステル骨格は-O-P-O-CH<sub>2</sub>-として表される)、ならびに上で言及した米国特許第5,602,240号のアミド骨格を組み込む。いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、上で言及した米国特許第5,034,506号のモルホリノ骨格構造を有する。

10

## 【0131】

修飾オリゴヌクレオチドはまた、1つ以上の置換された糖部分を含有することもできる。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、2'位に、OH; F; O-アルキル、S-アルキル、もしくはN-アルキル; O-アルケニル、S-アルケニル(alkeynyl)、もしくはN-アルケニル; O-アルキニル、S-アルキニル、もしくはN-アルキニル; またはO-アルキル-O-アルキルのうちの1つを含み、該アルキル、アルケニル、及びアルキニルは、置換または非置換のC1~C10アルキルまたはC2~C10アルケニル及びアルキニルであってもよい。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、O[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O]<sub>m</sub>CH<sub>3</sub>、O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OCH<sub>3</sub>、O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>、O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>、O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ONH<sub>2</sub>、及びO(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ON[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub>であり、式中、n及びmは、1~約10である。いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、2'位に、C1~C10低級アルキル、置換低級アルキル、アルケニル、アルキニル、アルカリール、アラルキル、O-アルカリール、もしくはO-アラルキル、SH、SCH<sub>3</sub>、OCN、Cl、Br、CN、CF<sub>3</sub>、OCF<sub>3</sub>、SOCH<sub>3</sub>、SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、ONO<sub>2</sub>、NO<sub>2</sub>、N<sub>3</sub>、NH<sub>2</sub>、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリール、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換シリル、RNA切断基、レポーター基、インターラーティー、オリゴヌクレオチドの薬物動態特性を改善するための基、またはオリゴヌクレオチドの薬力学的特性を改善するための基、及び類似の特性を有する他の置換基のうちの1つを含む。いくつかの実施形態では、修飾には、2'-(メトキシエトキシ(2'-O-(2-メトキシエチル)または2'-(MOE)としても知られる2'-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>)(Martin et al. (1995) Helv. Chim. Acta 78: 486-504)、すなわち、アルコキシアルコキシ基が含まれる。いくつかの実施形態では、修飾には、本明細書において以下の実施例に記載されている、2'-(DMAOE)としても知られる、2'-(ジメチルアミノオキシエトキシ)、すなわち、O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>ON(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>基、及び2'-(ジメチルアミノエトキシエトキシ(当技術分野で2'-O-ジメチルアミノエトキシエチルまたは2'-(DMAE)OEとしても知られる)、すなわち、2'-O-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)が含まれる。

20

## 【0132】

いくつかの実施形態では、修飾には、2'-(ヒドロキシル基が糖環の3'または4'の炭素原子と連結されており、それにより二環式の糖部分が形成されている、ロックされた核酸(LNA)が含まれる。連結は、いくつかの実施形態では、2'酸素原子と4'炭素原子とを架橋するメテリン(methelyne)(-CH<sub>2</sub>-)<sub>n</sub>基であり、式中、nは1または2である。LNA及びその調製は、WO98/39352及びWO99/14226に記載されている。

30

## 【0133】

いくつかの実施形態では、修飾には、2'-(メトキシ(2'-O-CH<sub>3</sub>)、2'-(アミノプロポキシ(2'-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>)、2'-(アリル(2'-CH=CH<sub>2</sub>))、2'-(O-アリル(2'-O-CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>))、及び2'-(フルオロ(2'-F))が含まれる。2'-(修飾は、アラビノ(上)位置またはリボ(下)位

40

50

置にあってもよい。いくつかの実施形態では、2' - アラビノ修飾は2' - Fである。同様の修飾は、オリゴヌクレオチド上の他の位置、特に、3' 末端ヌクレオチド上、または2' - 5' 連結のオリゴヌクレオチド中の糖の3' 位、及び5' 末端ヌクレオチドの5' 位で行なわれてもよい。オリゴヌクレオチドはまた、ペントフラノシル糖の代わりにシクロブチル部分などの糖模倣体を有していてもよい。そのような修飾された糖構造の調製を教示している代表的な米国特許には、限定されないが、米国特許第4,981,957号、第5,118,800号、第5,319,080号、第5,359,044号、第5,393,878号、第5,446,137号、第5,466,786号、第5,514,785号、第5,519,134号、第5,567,811号、第5,576,427号、第5,591,722号、第5,597,909号、第5,610,300号、第5,627,053号、第5,639,873号、第5,646,265号、第5,658,873号、第5,670,633号、第5,792,747号、及び第5,700,920号が含まれ、これらは各々、その全体が参考により本明細書に組み込まれる。

## 【0134】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドには、核酸塩基（多くの場合、当技術分野において単に「塩基」と呼ばれる）の修飾または置換も含まれ得る。本明細書で使用される「非修飾」または「天然」核酸塩基には、プリン塩基のアデニン（A）及びグアニン（G）、ならびにピリミジン塩基のチミン（T）、シトシン（C）、及びウラシル（U）が含まれる。修飾核酸塩基には、5-メチルシトシン（5-methyl-C）、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2-アミノアデニン、アデニン及びグアニンの6-メチル及び他のアルキル誘導体、アデニン及びグアニンの2-プロピル及び他のアルキル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミン、及び2-チオシトシン、5-ハロウラシル及びシトシン、5-プロピニル（-C=C-CH<sub>3</sub>または-CH<sub>2</sub>-C=CH）ウラシル及びシトシンならびにピリミジン塩基の他のアルキニル誘導体、6-アゾウラシル、シトシン、及びチミン、5-ウラシル（シュードウラシル）、4-チオウラシル、8-ハロ、8-アミノ、8-チオール、8-チオアルキル、8-ヒドロキシル、及び他の8-置換アデニン及びグアニン、5-ハロ、特に、5-プロモ、5-トリフルオロメチル、及び他の5-置換ウラシル及びシトシン、7-メチルグアニン及び7-メチルアデニン、2-F-アデニン、2-アミノ-アデニン、8-アザグアニン及び8-アザアデニン、7-デアザグアニン及び7-デアザアデニン、ならびに3-デアザグアニン及び3-デアザアデニンなどの、他の合成及び天然核酸塩基が含まれる。さらなる修飾核酸塩基には、三環系ピリミジン、例えば、フェノキサジンシチジン（1H-ピリミド[5,4-b][1,4]ベンズオキサジン-2（3H）-オン）、フェノチアジンシチジン（1H-ピリミド[5,4-b][1,4]ベンゾチアジン-2（3H）-オン）、G-クランプ、例えば、置換フェノキサジンシチジン（例えば、9-（2-アミノエトキシ）-H-ピリミド[5,4-b][1,4]ベンズオキサジン-2（3H）-オン）、カルバゾールシチジン（2H-ピリミド[4,5-b]インドール-2-オン）、ピリドインドールシチジン（H-ピリド[3',2':4,5]ピロ口[2,3-d]ピリミジン-2-オン）が含まれる。修飾核酸塩基には、プリンまたはピリミジン塩基が他の複素環で置き換えられているもの、例えば、7-デアザ-アデニン、7-デアザグアノシン、2-アミノピリジン、及び2-ピリドンも含まれ得る。さらなる核酸塩基には、米国特許第3,687,808号に開示されているもの、THE CONCISE ENCYCLOPEDIA OF POLYMER SCIENCE AND ENGINEERING, Kroschwitz, J. I., ed., John Wiley & Sons, 1990, pp. 858-859に開示されているもの、ならびにEnglisch et al., ANGEWANDTE CHEMIE, INTERNATIONAL EDITION, Wiley-VCH, Germany, 1991, 30: 613によって開示されているものが含まれる。これらの核酸塩基のうちの特定のものが、本開示のオリゴマー化合物の結合親和性を増大させるのに特に有用である。これらには、2-アミノプロピルアデニン、5-プロピニルウラシル、及び5-プロピニルシトシンを含む、5-置換ピリミジン、6-

10

20

30

40

50

アザピリミジン、ならびにN-2、N-6、及びO-6置換プリンが含まれる。5-メチルシトシン置換は、核酸二重鎖の安定性を0.6~1.2增加させることが示されており(Sanghvi et al. ANTISENSE RESEARCH AND APPLICATIONS, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278)、また、この置換は、可能性のある塩基置換であり、特に、2'-O-メトキシエチル糖修飾と組み合わされる場合でにはさらにそうである。修飾核酸塩基の調製を教示している代表的な米国特許には、限定されないが、米国特許第3,687,808号、ならびに米国特許第4,845,205号、第5,130,302号、第5,134,066号、第5,175,273号、第5,367,066号、第5,432,272号、第5,457,187号、第5,459,255号、第5,484,908号、第5,502,177号、第5,525,711号、第5,552,540号、第5,587,469号、第5,594,121; 5,596,091号、第5,614,617号、第5,645,985号、第5,830,653号、第5,763,588号、第6,005,096号、第5,681,941号、及び第5,750,692号が含まれ、これらは各々、参照により本明細書に組み込まれる。

## 【0135】

アンチセンスオリゴヌクレオチドの別の修飾は、オリゴヌクレオチドに、オリゴヌクレオチドの活性、細胞分布、または細胞取り込みを増強する1つ以上の部分またはコンジュゲートを化学的に連結させることを伴う。本開示の化合物は、第1級または第2級ヒドロキシル基などの官能基に共有結合したコンジュゲート基を含むことができる。本開示のコンジュゲート基には、インターラーカー、レポーター分子、ポリアミン、ポリアミド、ポリエチレンギリコール、ポリエーテル、オリゴマーの薬力学的特性を増強する基、及びオリゴマーの薬物動態特性を増強する基が含まれる。典型的なコンジュゲート基には、コレステロール、脂質、陽イオン脂質、リン脂質、陽イオン性リン脂質、ビオチン、フェナジン、フォレート、フェナントリジン、アントラキノン、アクリジン、フルオレセイン、ローダミン、クマリン、及び色素が含まれる。本開示との関連における、薬力学的特性を増強する基には、オリゴマーの取り込みを改善する基、分解に対するオリゴマーの耐性を増強する基、及び/またはRNAとの配列特異的ハイブリダイゼーションを強化する基が含まれる。本開示との関連における、薬物動態特性を増強する基には、オリゴマーの取り込み、分布、代謝、または排泄を改善する基が含まれる。コンジュゲート部分には、限定されないが、コレステロール部分(Letsinger et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6553-6556)、コール酸(Manoharan et al. (1994) Bioorg. Med. Chem. Lett. 4: 1053-1060)、チオエーテル、例えば、ヘキシル-S-トリチルチオール(Manoharan et al. (1992) Ann. N. Y. Acad. Sci. 660: 306-309、Manoharan et al. (1993) Bioorg. Med. Chem. Lett. 3: 2765-2770)、チオコレステロール(Oberhauser et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20: 533-538)、脂肪族鎖、例えば、ドデカンジオールもしくはウンデシル残基(Saison-Behmoaras et al. (1991) EMBO J. 10: 1111-1118、Kabanov et al. (1990) FEBS Lett. 259: 327-330、Svinarchuk et al. (1993) Biochimie 75: 49-54)、リン脂質、例えば、ジ-ヘキサデシル-rac-グリセロールもしくはトリエチル-アンモニウム1,2-ジ-O-ヘキサデシル-rac-グリセロ-3-H-ホスホネート(Manoharan et al. (1995) Tetrahedron Lett. 36: 3651-3654、Shea et al. (1990) Nucl. Acids Res. 18: 3777-3783)、ポリアミンもしくはポリエチレンギリコール鎖(Manoharan et al. (1995) Nucleosides & Nucleotides 14: 969-973)、またはアダマンタン酢酸(Manoharan et al. (1995) Tetrahedron Lett. 36: 3651-3654)、

t . 3 6 : 3 6 5 1 - 3 6 5 4 ) 、 パルミチル部分 ( M i s h r a e t a l . ( 1 9 9 5 ) B i o c h i m . B i o p h y s . A c t a 1 2 6 4 : 2 2 9 - 2 3 7 ) 、 またはオクタデシルアミンもしくはヘキシルアミノ - カルボニル - オキシコレステロール部分などの、脂質部分が含まれる。本開示のオリゴヌクレオチドはまた、活性薬物物質、例えば、アスピリン、ワルファリン、フェニルブタゾン、イブプロフェン、スプロフェン、フェンブフェン、ケトプロフェン、( S ) - ( + ) - プラノプロフェン、カルプロフェン、ダンシルサルコシン、2, 3, 5 - トリヨード安息香酸、フルフェナム酸、フォリン酸、ベンゾチアジアジド、クロロチアジド、ジアゼピン、インドメチシン、バルビツレート、セファロスボリン、スルファ薬、抗糖尿病薬、抗細菌薬、または抗生物質にコンジュゲートされていてもよい。オリゴヌクレオチド - 薬物コンジュゲート及びその調製は、米国特許第4, 828, 979号、第4, 948, 882号、第5, 218, 105号、第5, 525, 465号、第5, 541, 313号、第5, 545, 730号、第5, 552, 538号、第5, 578, 717; 5, 580, 731号、第5, 580, 731号、第5, 591, 584号、第5, 109, 124号、第5, 118, 802号、第5, 138, 045号、第5, 414, 077号、第5, 486, 603号、第5, 512, 439号、第5, 578, 718号、第5, 608, 046号、第4, 587, 044号、第4, 605, 735号、第4, 667, 025号、第4, 762, 779号、第4, 789, 737号、第4, 824, 941号、第4, 835, 263号、第4, 876, 335号、第4, 904, 582号、第4, 958, 013号、第5, 082, 830号、第5, 112, 963号、第5, 214, 136号、第5, 082, 830号、第5, 112, 963号、第5, 214, 136号、第5, 245, 022号、第5, 254, 469号、第5, 258, 506号、第5, 262, 536号、第5, 272, 250号、第5, 292, 873号、第5, 317, 098号、第5, 371, 241; 5, 391, 723号、第5, 416, 203号; 5, 451, 463号、第5, 510, 475号、第5, 512, 667号、第5, 514, 785号、第5, 565, 552号、第5, 567, 810号、第5, 574, 142号、第5, 585, 481号、第5, 587, 371号、第5, 595, 726号、第5, 597, 696号、第5, 599, 923号、第5, 599, 928号、第5, 688, 941号、及び第6, 656, 730号に記載されており、これらは各々、参照により本明細書に組み込まれる。

## 【0136】

所与の化合物中の全ての位置が均一に修飾されている必要はなく、実際、前述の修飾のうちの2つ以上が、単一の化合物、またはさらにはオリゴヌクレオチド内の単一のヌクレオシド中に組み込まれていてもよい。本開示には、キメラ化合物であるアンチセンス化合物も含まれる。本開示との関連における、「キメラ」アンチセンス化合物または「キメラ」は、各々が少なくとも1つの単量体単位、すなわち、オリゴヌクレオチド化合物の場合はヌクレオチドから構成される、2つ以上の化学的に異なる領域を含有するアンチセンス化合物、特に、オリゴヌクレオチドである。これらのオリゴヌクレオチドは、通常、オリゴヌクレオチドに、ヌクレアーゼ分解に対する増大した耐性、増大した細胞取り込み、及び/または標的核酸に対する増大した結合親和性を付与するように、オリゴヌクレオチドが修飾されている、少なくとも1つの領域を含有する。オリゴヌクレオチドのさらなる領域は、R N A : D N A またはR N A : R N Aハイブリッドを切断することができる酵素の基質としての役割を果たし得る。例として、R N A - H は、R N A : D N A二重鎖のR N A鎖を切断する細胞エンドヌクレアーゼである。それゆえ、R N A - Hの活性化は、R N A標的の切断をもたらし、それにより、遺伝子発現のオリゴヌクレオチド阻害の効率を大いに増強する。その結果、多くの場合、同じ標的領域にハイブリダイズするホスホロチオエートデオキシオリゴヌクレオチドと比べて、キメラオリゴヌクレオチドを使用する場合に、より短いオリゴヌクレオチドで同程度の結果を得ることができる。本開示のキメラアンチセンス化合物は、上記のような2つ以上のオリゴヌクレオチド、修飾オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオシド、及び/またはオリゴヌクレオチド模倣体の複合構造物として形成させることができる。いくつかの実施形態では、キメラアンチセンスオリゴヌク

10

20

30

40

50

レオチドは、ヌクレアーゼ耐性を付与するために、3'末端に少なくとも1つの2'修飾糖（例えば、2'-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>）を組み込み、かつRNアーゼH活性を付与するために、少なくとも4つの連続的な2'-H糖を有する領域を取り込んでいる。そのような化合物は、当技術分野でハイブリッドまたはギャップマーとも呼ばれている。いくつかの実施形態では、ギャップマーは、3'末端及び5'末端に、少なくとも4つの連続的な2'-H糖を有する少なくとも1つの領域によって隔てられた2'修飾糖（例えば、2'-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>）の領域を有しており、いくつかの実施形態では、ホスホロチオエート骨格連結を組み込んでいる。そのようなハイブリッド構造の調製を教示している代表的な米国特許には、限定されないが、米国特許第5,013,830号、第5,149,797号、第5,220,007号、第5,256,775号、第5,366,878号、第5,403,711号、第5,491,133号、第5,565,350号、第5,623,065号、第5,652,355号、第5,652,356号、及び第5,700,922号が含まれ、これらは各々、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

## 【0137】

本開示に従って使用されるアンチセンス化合物は、固相合成の周知の技法によって好都合かつ慣習的に作製することができる。そのような合成のための機器は、例えば、Applied Biosystems (Foster City, Calif.) を含むいくつかの販売業者によって販売されている。当技術分野で既知のそのような合成のための任意の他の手段を、それに加えてまたはその代わりに用いてもよい。同様の技法を使用してホスホロチオエート及びアルキル化誘導体などのオリゴヌクレオチドを調製することが周知である。本開示の化合物は、取り込み、分布、及び/または吸収を助けるための、例えば、リポソーム、受容体標的分子、経口、直腸、局所、または他の製剤として、他の分子、分子構造、または化合物の混合物と混合するか、これらとともに封入するか、これらとコンジュゲートするか、またはこれらと別の方法で関連させててもよい。そのような取り込み、分布、及び/または吸収を助ける製剤の調製を教示している代表的な米国特許には、限定されないが、米国特許第5,108,921号、第5,354,844号、第5,416,016号、第5,459,127号、第5,521,291号、第5,543,158号、第5,547,932号、第5,583,020号、第5,591,721号、第4,426,330号、第4,534,899号、第5,013,556号、第5,108,921号、第5,213,804号、第5,227,170号、第5,264,221号、第5,356,633号、第5,395,619号、第5,416,016号、第5,417,978号、第5,462,854号、第5,469,854号、第5,512,295号、第5,527,528号、第5,534,259号、第5,543,152号、第5,556,948号、第5,580,575号、及び第5,595,756号が含まれ、これらは各々、参照により本明細書に組み込まれる。

20

30

40

## 【0138】

センスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドの他の例には、WO 90/10048に記載されているものなどの有機部分、及びポリ-(L-リジン)などの、標的核酸配列に対するオリゴヌクレオチドの親和性を増大させる他の部分に共有結合しているオリゴヌクレオチドが含まれる。またさらに、エリプチシンなどのインターラート剤、及びアルキル化剤または金属錯体をセンスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドに付着させて、標的ヌクレオチド配列に対するアンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドの結合特異性を修飾することができる。

## 【0139】

アンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、CaPO<sub>4</sub>によって媒介されるDNAトランスフェクション、エレクトロポレーション、またはエプスタイン-バウイルスなどの遺伝子移入ベクターを使用することによるものを含む、任意の遺伝子移入方法によって、標的核酸配列を含む細胞内に導入し得る。一実施形態では、アンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドを好適なレトロウイルスベクターに挿入する。標的核酸

50

配列を含む細胞を、インビオまたはエクスピオのどちらかで、組換えレトロウイルスベクターと接触させる。好適なレトロウイルスベクターには、限定されないが、マウスレトロウイルスM-MuLVに由来するもの、N2 (M-MuLVに由来するレトロウイルス)、またはDCT5A、DCT5B、及びDCT5Cと命名された二重コピーベクター (WO90/13641を参照) が含まれる。

【0140】

センスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドは、WO91/04753に記載されているように、リガンド結合分子とのコンジュゲートの形成によって、標的ヌクレオチド配列を含む細胞内に導入してもよい。好適なリガンド結合分子には、限定されないが、細胞表面受容体、成長因子、他のサイトカイン、または細胞表面受容体に結合する他のリガンドが含まれる。いくつかの実施形態では、リガンド結合分子のコンジュゲーションは、リガンド結合分子がその対応する分子または受容体に結合する能力を実質的に妨害することもないし、センスもしくはアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはそのコンジュゲート型の細胞内への進入を遮断することもない。

10

【0141】

あるいは、センスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドは、WO90/10448に記載されているように、オリゴヌクレオチド-脂質複合体の形成によって、標的核酸配列を含む細胞内に導入してもよい。センスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチド-脂質複合体は、いくつかの実施形態では、内在性リパーゼによって細胞内で解離する。

20

【0142】

アンチセンスまたはセンスRNAまたはDNA分子は、通常、長さが少なくとも約5ヌクレオチド、あるいは長さが少なくとも約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、または1000ヌクレオチドであり、この文脈において、「約」という用語は、言及されたヌクレオチド配列の長さ±その言及された長さの10%を意味する。

30

【0143】

突然変異体SMOをコードするヌクレオチド配列を使用して、そのSMOをコードする遺伝子をマッピングするための、及び遺伝的障害を有する個体の遺伝子分析のためのハイブリダイゼーションプローブを構築することもできる。インサイチュハイブリダイゼーション、既知の染色体マーカーに対する連鎖分析、及びライブラリーを用いるハイブリダイゼーションスクリーニングなどの既知の技術を使用して、本明細書で提供されるヌクレオチド配列を染色体及び染色体の特定の領域にマッピングすることができる。

40

【0144】

潜在的な突然変異体SMOアンタゴニストは、アンチセンス技術を使用して調製されるアンチセンスRNAまたはDNAコンストラクトであり、この場合、例えば、アンチセンスRNAまたはDNA分子は、標的とされるmRNAにハイブリダイズし、タンパク質の翻訳を妨げることによって、mRNAの翻訳を直接遮断するように作用する。アンチセンス技術を使用して、三重ヘリックス形成またはアンチセンスDNAもしくはRNAによっ

50

て遺伝子発現を制御することができ、これらの方法はどちらも、オリゴクレオチドとDNAまたはRNAとの結合に基づいている。例えば、本明細書中の突然変異体SMOをコードする核酸を使用して、長さが約10～40塩基対のアンチセンスRNAオリゴヌクレオチドを設計する。DNAオリゴヌクレオチドを、転写に関与する遺伝子の領域に相補的であるように設計し(三重螺旋-Lee et al. (1979) Nucl. Acids Res. 6: 3073、Cooney et al. (1988) Science 241: 456、Derivan et al. (1991) Science 251: 1360を参照)、それにより、突然変異体SMOの転写及び産生を妨げる。アンチセンスRNAオリゴヌクレオチドは、インビボでmRNAにハイブリダイズし、mRNA分子から突然変異体SMOへの翻訳を遮断する(Okano (1991) Neurochem. 56: 560)、OLIGODEOXYNUCLEOTIDES AS ANTISENSE INHIBITORS OF GENE EXPRESSION, CRC Press, Boca Raton, FL, 1988)。上記のオリゴヌクレオチドは、アンチセンスRNAまたはDNAがインビボで発現されて、突然変異体SMOの産生を阻害し得るように、細胞に送達することもできる。アンチセンスDNAを使用する場合、いくつかの実施形態では、翻訳開始部位、例えば、標的遺伝子ヌクレオチド配列の約-10～+10の位置に由来するオリゴデオキシリボヌクレオチドを使用し得る。

10

## 【0145】

本核酸のうちのいずれも、突然変異体SMOタンパク質の発現、及びその発現された突然変異体スムースンドタンパク質(例えば、野生型ヒトSMOなどの野生型SMOに対するT241M、W281C、I408V、A459V、C469Y、S533N、及び/またはW535L突然変異を有するスムースンドタンパク質)のための天然の標的または結合パートナーの同定における使用に好適である。また、本核酸を使用して、突然変異体スムースンド生物活性を研究し、突然変異体スムースンド及びその結合パートナーを様々な細胞及び組織から精製し、ヘッジホッギングナル伝達経路のさらなる成分を同定し得る。

20

## 【0146】

## II. 小分子

突然変異体SMOの可能性のあるアンタゴニストには、野生型SMO中でGDC-0449によって占有される部位に結合し、それにより、突然変異体SMOの生物活性を遮断する小分子が含まれる。小分子の例には、限定されないが、小ペプチドまたはペプチド様分子、例えば、可溶性ペプチド、及び非ペプチジル合成有機または無機化合物が含まれる。

30

## 【0147】

リボザイムは、RNAの特異的切断を触媒することができる酵素的RNA分子である。リボザイムは、相補的な標的RNAに対する配列特異的ハイブリダイゼーションと、その後のエンドヌクレアーゼ切断によって作用する。潜在的RNA標的内の特異的なリボザイム切断部位は、既知の技術によって同定することができる。さらなる詳細については、例えば、Rossi (1994) Current Biology, 4: 469-471、及びPCT公開第WO97/33551号(1997年9月18日公開)を参照されたい。

40

## 【0148】

転写を阻害するために使用される三重螺旋形成中の核酸分子は、一本鎖であり、かつデオキシリボヌクレオチドから構成されるべきである。これらのオリゴヌクレオチドの塩基組成は、それが、フーグスティーン塩基対形成則を介する三重螺旋形成を促進するように設計されており、このフーグスティーン塩基対形成則は、通常、二重鎖の一方の鎖上にプリンまたはピリミジンのかなり大きなストレッチを必要とする。さらなる詳細については、例えば、前出のPCT公開第WO97/33551号を参照されたい。

## 【0149】

これらの小分子は、本明細書において上で考察したスクリーニングアッセイのうちのい

50

ずれか1つ以上によって、及び／または当業者に周知の任意の他のスクリーニング技術によって同定することができる。

【0150】

I I I . タンパク質

本開示は、単離された突然変異体SMOタンパク質を提供する。野生型ヒトSMOは配列番号1に示されている。いくつかの実施形態では、突然変異体SMOタンパク質は、ビスモデギブに対して部分的または完全に耐性である。いくつかの実施形態では、突然変異体SMOタンパク質は、ヘッジホッグシグナル伝達経路においてタンパク質をコードする遺伝子にさらなる突然変異を有する細胞においてビスモデギブに対して部分的または完全に耐性である突然変異体SMOタンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、さらなる突然変異は、本明細書に記載のpatched及び／またはSUFU突然変異のうちのいずれかである。

10

【0151】

いくつかの実施形態では、本開示は、アミノ酸配列を含む単離された突然変異体SMOタンパク質を提供し、該アミノ酸配列は、野生型SMOアミノ酸配列の位置239に対応するアミノ酸位置でアラニン以外のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、SMOタンパク質は、配列番号1と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含むが、但し、アミノ酸位置239に置換が存在する。いくつかの実施形態では、SMOタンパク質は、配列番号1と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または100%同一であるアミノ酸配列を含むが、但し、該アミノ酸配列は、配列番号1の位置239に対応するアミノ酸位置でアラニン(A)以外のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、SMOタンパク質は、配列番号1と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含むが、但し、このSMOタンパク質は、配列番号1の位置239に対応するアミノ酸位置でバリン(V)を含む。

20

【0152】

いくつかの実施形態では、本開示は、アミノ酸配列を含む単離された突然変異体SMOタンパク質を提供し、該アミノ酸配列は、野生型SMOアミノ酸配列の位置241に対応するアミノ酸位置でトレオニン以外のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、SMOタンパク質は、配列番号1と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含むが、但し、アミノ酸位置241に置換が存在する。いくつかの実施形態では、SMOタンパク質は、配列番号1と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含むが、但し、該アミノ酸配列は、配列番号1の位置241に対応するアミノ酸位置でトレオニン(T)以外のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、SMOタンパク質は、配列番号1と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含むが、但し、このSMOタンパク質は、配列番号1の位置241に対応するアミノ酸位置でメチオニン(M)を含む。

30

【0153】

いくつかの実施形態では、本開示は、アミノ酸配列を含む単離された突然変異体SMOタンパク質を提供し、該アミノ酸配列は、野生型SMOアミノ酸配列の位置281に対応するアミノ酸位置でトリプトファン以外のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、SMOタンパク質は、配列番号1と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含むが、但し、

40

50

または 100% 同一であるアミノ酸配列を含むが、但し、アミノ酸位置 281 に置換が存在する。いくつかの実施形態では、SMO タンパク質は、配列番号 1 と少なくとも 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% 同一であるアミノ酸配列を含むが、但し、該アミノ酸配列は、配列番号 1 の位置 281 に対応するアミノ酸位置でトリプトファン (W) 以外のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、SMO タンパク質は、配列番号 1 と少なくとも 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% 同一であるアミノ酸配列を含むが、但し、この SMO タンパク質は、配列番号 1 の位置 281 に対応するアミノ酸位置でシステイン (C) を含む。

10

## 【0154】

いくつかの実施形態では、本開示は、アミノ酸配列を含む単離された突然変異体 SMO タンパク質を提供し、該アミノ酸配列は、野生型 SMO アミノ酸配列の位置 408 に対応するアミノ酸位置でイソロイシン以外のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、SMO タンパク質は、配列番号 1 と少なくとも 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% 同一であるアミノ酸配列を含むが、但し、アミノ酸位置 408 に突然変異が存在する。いくつかの実施形態では、SMO タンパク質は、配列番号 1 と少なくとも 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% 同一であるアミノ酸配列を含むが、但し、該アミノ酸配列は、配列番号 1 の位置 408 に対応するアミノ酸位置でイソロイシン (I) 以外のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、SMO タンパク質は、配列番号 1 と少なくとも 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% 同一であるアミノ酸配列を含むが、但し、この SMO タンパク質は、配列番号 1 の位置 408 に対応するアミノ酸位置でバリン (V) を含む。

20

## 【0155】

いくつかの実施形態では、本開示は、アミノ酸配列を含む単離された突然変異体 SMO タンパク質を提供し、該アミノ酸配列は、野生型 SMO アミノ酸配列の位置 459 に対応するアミノ酸位置でアラニン以外のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、SMO タンパク質は、配列番号 1 と少なくとも 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% 同一であるアミノ酸配列を含むが、但し、アミノ酸位置 459 に突然変異が存在する。いくつかの実施形態では、SMO タンパク質は、配列番号 1 と少なくとも 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% 同一であるアミノ酸配列を含むが、但し、該アミノ酸配列は、配列番号 1 の位置 459 に対応するアミノ酸位置でアラニン (A) 以外のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、SMO タンパク質は、配列番号 1 と少なくとも 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% 同一であるアミノ酸配列を含むが、但し、この SMO タンパク質は、配列番号 1 の位置 459 に対応するアミノ酸位置でバリン (V) を含む。

30

## 【0156】

いくつかの実施形態では、本開示は、アミノ酸配列を含む単離された突然変異体 SMO タンパク質を提供し、該アミノ酸配列は、野生型 SMO アミノ酸配列の位置 469 に対応するアミノ酸位置でシステイン以外のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、SMO タンパク質は、配列番号 1 と少なくとも 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% 同一であるアミノ酸配列を含むが、但し、アミノ酸位置 469 に突然変異が存在する。いくつかの実施形態では、SMO タンパク質は、配列番号 1 と少なくとも 85%

40

50

、 8 6 %、 8 7 %、 8 8 %、 8 9 %、 9 0 %、 9 1 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 %、 または 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含むが、但し、該アミノ酸配列は、配列番号 1 の位置 4 6 9 に対応するアミノ酸位置でシスティン ( C ) 以外のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、S M O タンパク質は、配列番号 1 と少なくとも 8 5 %、 8 6 %、 8 7 %、 8 8 %、 8 9 %、 9 0 %、 9 1 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 %、 または 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含むが、但し、この S M O タンパク質は、配列番号 1 の位置 4 6 9 に対応するアミノ酸位置でチロシン ( Y ) を含む。

## 【 0 1 5 7 】

いくつかの実施形態では、本開示は、アミノ酸配列を含む単離された突然変異体 S M O タンパク質を提供し、該アミノ酸配列は、野生型 S M O アミノ酸配列の位置 5 3 3 に対応するアミノ酸位置でセリン以外のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、S M O タンパク質は、配列番号 1 と少なくとも 8 5 %、 8 6 %、 8 7 %、 8 8 %、 8 9 %、 9 0 %、 9 1 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 %、 または 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含むが、但し、アミノ酸位置 5 3 3 に突然変異が存在する。いくつかの実施形態では、S M O タンパク質は、配列番号 1 と少なくとも 8 5 %、 8 6 %、 8 7 %、 8 8 %、 8 9 %、 9 0 %、 9 1 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 %、 または 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含むが、但し、該アミノ酸配列は、配列番号 1 の位置 5 3 3 に対応するアミノ酸位置でセリン ( S ) 以外のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、S M O タンパク質は、配列番号 1 と少なくとも 8 5 %、 8 6 %、 8 7 %、 8 8 %、 8 9 %、 9 0 %、 9 1 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 %、 または 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含むが、但し、この S M O タンパク質は、配列番号 1 の位置 5 3 3 に対応するアミノ酸位置でアスパラギン ( N ) を含む。

## 【 0 1 5 8 】

いくつかの実施形態では、本開示は、アミノ酸配列を含む単離された突然変異体 S M O タンパク質を提供し、該アミノ酸配列は、野生型 S M O アミノ酸配列の位置 5 3 5 に対応するアミノ酸位置でトリトファン ( t r y t o p h a n ) 以外のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、S M O タンパク質は、配列番号 1 と少なくとも 8 5 %、 8 6 %、 8 7 %、 8 8 %、 8 9 %、 9 0 %、 9 1 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 %、 または 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含むが、但し、アミノ酸位置 5 3 5 に突然変異が存在する。いくつかの実施形態では、S M O タンパク質は、配列番号 1 と少なくとも 8 5 %、 8 6 %、 8 7 %、 8 8 %、 8 9 %、 9 0 %、 9 1 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 %、 または 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含むが、但し、該アミノ酸配列は、配列番号 1 の位置 5 3 5 に対応するアミノ酸位置でトリプトファン ( W ) 以外のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、S M O タンパク質は、配列番号 1 と少なくとも 8 5 %、 8 6 %、 8 7 %、 8 8 %、 8 9 %、 9 0 %、 9 1 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 %、 または 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含むが、但し、この S M O タンパク質は、配列番号 1 の位置 5 3 5 に対応するアミノ酸位置でロイシン ( L ) を含む。

## 【 0 1 5 9 】

いくつかの実施形態では、S M O タンパク質は、配列番号 1 と少なくとも 8 5 %、 8 6 %、 8 7 %、 8 8 %、 8 9 %、 9 0 %、 9 1 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 %、 または 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含むが、但し、この S M O タンパク質は、表 4 に示すアミノ酸突然変異のうちの少なくとも 1 つを含む ( 実施例 6 を参照 ) 。

## 【 0 1 6 0 】

いくつかの実施形態では、突然変異体ヒト S M O は、配列番号 6 に示されており、該配列中、アミノ酸 2 4 1 は、本出願に関して、トレオニン ( T ) 以外の任意のアミノ酸を表す「 X a a 」として示されている。いくつかの実施形態では、 X a a はメチオニン ( M )

10

20

30

40

50

である。

#### 【0161】

いくつかの実施形態では、突然変異体ヒトSMOは、配列番号2に示されており、該配列中、アミノ酸281は、本出願に関して、トリプトファン(W)以外の任意のアミノ酸を表す「Xaa」として示されている。いくつかの実施形態では、Xaaはシステイン(C)である。

#### 【0162】

いくつかの実施形態では、突然変異体ヒトSMOは、配列番号7に示されており、該配列中、アミノ酸408は、本出願に関して、イソロイシン(I)以外の任意のアミノ酸を表す「Xaa」として示されている。いくつかの実施形態では、Xaaはバリン(V)である。

#### 【0163】

いくつかの実施形態では、突然変異体ヒトSMOは、配列番号3に示されており、該配列中、アミノ酸459は、本出願に関して、アラニン(A)以外の任意のアミノ酸を表す「Xaa」として示されている。いくつかの実施形態では、Xaaはバリン(V)である。

#### 【0164】

いくつかの実施形態では、突然変異体ヒトSMOは、配列番号8に示されており、該配列中、アミノ酸469は、本出願に関して、システイン(C)以外の任意のアミノ酸を表す「Xaa」として示されている。いくつかの実施形態では、Xaaはチロシン(Y)である。

#### 【0165】

いくつかの実施形態では、突然変異体ヒトSMOは、配列番号9に示されており、該配列中、アミノ酸533は、本出願に関して、セリン(S)以外の任意のアミノ酸を表す「Xaa」として示されている。いくつかの実施形態では、Xaaはアスパラギン(N)である。

#### 【0166】

いくつかの実施形態では、Xaaはバリン(V)である。いくつかの実施形態では、突然変異体ヒトSMOは、配列番号4に示されており、該配列中、アミノ酸535は、本出願に関して、トリプトファン(W)以外の任意のアミノ酸を表す「Xaa」として示されている。いくつかの実施形態では、Xaaはロイシン(L)である。

#### 【0167】

いくつかの実施形態では、突然変異体SMOタンパク質のうちのいずれかは、配列番号1～9のいずれかの位置1に対応するN末端メチオニンを欠く。

#### 【0168】

突然変異体SMO及びその断片は、本明細書に記載の突然変異体SMO核酸を使用して、当技術分野で周知であるように組換え系で產生させることができる。そのような核酸を、当技術分野で周知であるような発現ベクターに組み込み、タンパク質の提案される用途に応じて原核細胞または真核細胞であり得る宿主細胞内にトランスフェクトし得る。例えば、完全長突然変異体SMOまたはその断片(断片は、少なくとも、SMOの第1の膜貫通及びヒトSMOの位置214、SMOの第2の膜貫通ドメイン及びヒトSMOの位置281、SMOの第5の膜貫通ドメイン及びヒトSMOの位置408、SMOの第6の膜貫通ドメイン及びヒトSMOの位置459もしくは469、ならびに/またはSMOの第7の膜貫通及びヒトSMOの位置533もしくは535を含む)を免疫原として使用して、本開示の抗体を產生させるか、または本開示の抗体を精製し得る。

#### 【0169】

いくつかの実施形態では、SMOタンパク質またはその断片は、野生型SMOポリペプチド(例えば、配列番号1のアミノ酸配列を有するSMOタンパク質)の同じ生物活性のうちの少なくとも1つを有する。いくつかの実施形態では、突然変異体SMOタンパク質(例えば、配列番号1のアミノ酸241または459に対応するアミノ酸位置で突然変異

10

20

30

40

50

を有する SMO タンパク質) は、野生型 SMO タンパク質( 例えば、配列番号 1 のアミノ酸配列を有する SMO タンパク質) と比較して増加した基礎生物活性レベルを有する。「生物活性( biological activity )」、「生物活性( bioactivity )」、または「機能的」という用語は、SMO タンパク質またはその断片が野生型 SMO タンパク質と関連する機能、例えば、ヘッジホッギナル伝達経路の形質導入及び/または G11 発現の誘導のうちの少なくとも 1 つを実行する能力を意味する。ある特定の実施形態では、SMO タンパク質は、キネシンモータータンパク質 Costal - 2 と結合する。「生物活性( biological activity )」、「生物活性( bioactivity )」、及び「機能的」という用語は本明細書では互換的に使用される。

10

## 【 0170 】

いくつかの実施形態では、SMO タンパク質のうちのいずれか( 例えば、本明細書に記載の突然変異体 SMO タンパク質のうちのいずれか) は、ヘッジホッギナル伝達を伝えることができる。「能力を有する」または「することができる」という用語は、記載のタンパク質が、好適な条件( 例えば、生理学的条件または標準的な研究室条件) 下で記される生物活性を実行することを意味する。ある特定の実施形態では、「できる( can )」という用語は、この能力( 例えば、所与の配列に「結合することができる」または「結合する」) を説明するために使用し得る。例えば、SMO タンパク質( 例えば、本明細書に記載の突然変異体 SMO タンパク質のうちのいずれか) がヘッジホッギナル伝達を促進する能力を有するか、またはそれを促進することができる場合に、SMO タンパク質は、正常な生理学的条件下で細胞におけるヘッジホッギナル伝達を促進することができる。当業者であれば、ポリペプチドが記載の生物活性を実行する能力を有するか、またはそれを実行することができるかどうかを試験するためにどの条件が必要であるかを理解する。

20

## 【 0171 】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の SMO 及び突然変異体 SMO タンパク質は、スムースンド機能獲得型突然変異を含む。いくつかの実施形態では、機能獲得型スムースンド突然変異は、構成的に活性なスムースンドタンパク質をもたらす。ある特定の実施形態では、スムースンドにおける突然変異は、スクリーニングアッセイに関して上で示したように、配列番号 1 における特別な位置に対応する位置などの特定の位置のうちのいずれかで突然変異を含む。例えば、各々参照により本明細書に組み込まれる WO 2011 / 028950 及び WO 2012047968 を参照されたい。いくつかの実施形態では、スムースンド突然変異は、配列番号 1 の位置 535 に対応する位置での突然変異である。ある特定の実施形態では、突然変異は、配列番号 1 の位置 562 に対応する位置での突然変異である。ある特定の実施形態では、突然変異は、位置 535 での、または配列番号 1 におけるその対応する位置での W535L である。いくつかの実施形態では、スムースンド突然変異は、配列番号 1 の R562Q に対応する突然変異( 位置 562 での、または配列番号 1 の位置 562 に対応する位置での R562Q 突然変異) である。いくつかの実施形態では、スムースンド突然変異は、配列番号 1 の位置 412 に対応する位置での突然変異、例えば、配列番号 1 のそのような位置での L412F である。いくつかの実施形態では、スムースンド突然変異は、それを有する特定のスムースンド阻害剤に対して耐性にする代替の突然変異を有する。いくつかの実施形態では、スムースンドタンパク質は、配列番号 1 のアミノ酸位置 518 で、または配列番号 1 の位置 518 に対応する位置で、代替のアミノ酸変化を含む。いくつかの実施形態では、アミノ酸変化は、配列番号 1 のアミノ酸位置 518 に対応するアミノ酸位置での E518K または E518A 置換である。いくつかの実施形態では、スムースンドタンパク質は、配列番号 1 のアミノ酸位置 473 で、または配列番号 1 の位置 473 に対応する位置で、アミノ酸変化を含む。

30

## 【 0172 】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の SMO タンパク質のうちのいずれか( 例えば、本明細書に記載の突然変異体 SMO タンパク質のいずれか) は、別の薬剤に融合され

40

50

る。いくつかの実施形態では、SMOタンパク質は、別のポリペプチドに融合される。

【0173】

本明細書に記載の突然変異体SMOタンパク質うちのいずれも、突然変異体スマースンドタンパク質（例えば、T241M、W281C、I408V、A459V、C469Y、S533N、及び／またはW535L突然変異を有するスマースンドタンパク質）のための天然の標的または結合パートナーの同定における使用に好適である。また、本突然変異体SMOタンパク質を使用して、突然変異体スマースンド生物活性を研究し、突然変異体スマースンド及びその結合パートナーを様々な細胞及び組織から精製し、ヘッジホッグシグナル伝達経路のさらなる成分を同定し得る。

【0174】

I V . 抗体

A . 抗突然変異体SMO抗体

一態様では、本開示は、SMO、特に、突然変異体SMOに結合する抗体を提供する。いくつかの実施形態では、本明細書に開示の抗体のいずれも、本明細書に記載の突然変異体SMOポリペプチドのいずれかに特異的に結合する。例えば、突然変異体SMOポリペプチドは、本開示の抗体が特異的に結合するエピトープを含む。いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号1と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含むが、但し、配列番号1の位置241、281、408、459、469、533、及び／または535に対応するアミノ酸位置で突然変異が存在する、SMOタンパク質と特異的に結合する。いくつかの実施形態では、本抗体は、配列番号1のアミノ酸配列を有するSMOタンパク質と特異的に結合しないか、または配列番号1のアミノ酸配列を有するSMOタンパク質と比較して突然変異体SMOタンパク質と選択的に結合する（例えば、結合は突然変異体SMOタンパク質に選択的である）。いくつかの実施形態では、本抗体は、配列番号1の位置241、281、408、459、469、533、及び／または535に対応するアミノ酸位置のいずれか1つで突然変異を欠くSMOタンパク質と結合しない。

10

20

30

40

50

【0175】

一実施形態では、抗SMO抗体はモノクローナル抗体である。一実施形態では、抗SMO抗体は、抗体断片、例えば、Fab、Fab'-SH、Fv、scFv、または(Fab')<sub>2</sub>断片である。一実施形態では、抗突然変異体SMO抗体は、キメラ、ヒト化、またはヒト抗体である。一実施形態では、抗SMO抗体は精製されている。特定の実施形態では、組成物は、癌の治療のための医薬製剤である。

【0176】

1 . 抗体断片

本開示は抗体断片を包含する。抗体断片は、酵素消化などの従来の手段によるか、または組換え技術によって生成することができる。特定の状況下では、完全抗体ではなく、抗体断片を使用することに利点がある。断片のサイズがより小さいために、迅速なクリアランスが可能となり、固形腫瘍への接近の改善がもたらされ得る。ある特定の抗体断片の総説については、Hudson et al. (2003) Nat. Med. 9: 129-134を参照されたい。

【0177】

抗体断片を産生するために、様々な技法が開発されている。従来、これらの断片は、インタクト抗体のタンパク質分解的消化を介して得られた（例えば、Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24: 107-117 (1992)、及びBrennan et al., Science, 229: 81 (1985)を参照されたい）。しかしながら、これらの断片は、現在、組換え宿主細胞によって直接産生させることができる。Fab、Fv、及びscFv抗体断片は全て、大腸菌で発現させ、大腸菌から分泌させることができ、したがって、大量のこれらの断片の容易な産生が可能となる。抗体断片は、上

で論じた抗体ファージライブラリーから単離することができる。あるいは、 $Fab'$  - SH断片を大腸菌から直接回収し、化学的に結合させて、 $F(ab')断片を形成させることができる(Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992))。別の手法によれば、 $F(ab')断片は、組換え宿主細胞培養物から直接単離することができる。サルベージ受容体結合エピトープ残基を含む、インビオ半減期が増大した $Fab$ 及び $F(ab')断片は、米国特許第5,869,046号に記載されている。抗体断片を産生させるための他の技術は、当業者には明らかとなる。特定の実施形態では、抗体は、単鎖Fv断片(scFv)である。WO93/16185、米国特許第5,571,894、及び第5,587,458号を参照されたい。Fv及びscFvは、定常領域を欠くインタクトな結合部位を有する唯一の種であり、したがって、それらは、インビオ使用時の低下した非特異的結合に好適であり得る。scFv融合タンパク質は、scFvのアミノ末端またはカルボキシ末端のどちらかでエフェクタータンパク質との融合を生じるように構築することができる。前出のAntibody Engineering, ed. Borrebaeckを参照されたい。抗体断片はまた、例えば、米国特許第5,641,870号に記載されているような、「直鎖抗体」であってもよい。そのような直鎖抗体は单一特異性または二重特異性であり得る。$$$

10

## 【0178】

## 2. ヒト化抗体

本開示はヒト化抗体を包含する。非ヒト抗体をヒト化するための様々な方法が当技術分野で既知である。例えば、ヒト化抗体は、その中に導入された、非ヒトである供給源由來の1つ以上のアミノ酸残基を有することができる。これらの非ヒトアミノ酸残基は、しばしば「輸入(import)」残基と呼ばれ、これらは通常、「輸入」可変ドメインから取られる。ヒト化は、Winter及び共同研究者らの方法(Jones et al. (1986) Nature 321:522-525, Riechmann et al. (1988) Nature 332:323-327, Verhoeyen et al. (1988) Science 239:1534-1536)に従って、超可変領域配列をヒト抗体の対応する配列の代わりに用いることによって、本質的に実施することができる。したがって、そのような「ヒト化」抗体は、キメラ抗体であり(米国特許第4,816,567号)、その場合、インタクトなヒト可変ドメインには実質的に満たないものが、非ヒト種由來の対応する配列によって置換されている。実際には、ヒト化抗体は、通常、いくつかの超可変領域残基、及び場合によってはいくつかのFR残基が齧歯類抗体中の類似部位の残基によって置換されている、ヒト抗体である。

20

## 【0179】

ヒト化抗体を作製する際に使用するべき軽鎖及び重鎖の両方のヒト可変ドメインの選択は、抗原性を低下させるために重要であり得る。いわゆる「ベストフィット」法に従って、齧歯類抗体の可変ドメインの配列を、既知のヒト可変ドメイン配列のライブラリー全体に対してスクリーニングする。その後、齧歯類のものに最も近いヒト配列を、ヒト化抗体のヒトフレームワークとして許容する。例えば、Sims et al. (1993) J. Immunol. 151:2296, Chothia et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901を参照されたい。別の方は、軽鎖または重鎖の特定のサブグループの全てのヒト抗体のコンセンサス配列に由来する特定のフレームワークを使用する。同じフレームワークをいくつかの異なるヒト化抗体に使用し得る。例えば、Carter et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285, Presta et al. (1993) J. Immunol., 151:2623を参照されたい。

30

## 【0180】

通常、抗体は、抗原に対する高い親和性及び他の有利な生物学的特性を保持してヒト化されることがさらに望ましい。この目的を達成するために、1つの方法によれば、ヒト化抗体は、親配列及びヒト化配列の三次元モデルを使用した、親配列及び様々な概念的ヒト化産物の分析の過程によって調製される。三次元免疫グロブリンモデルは一般に利用可能

40

50

であり、当業者によく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の推定三次元立体構造を例示及び表示するコンピュータプログラムが利用可能である。これらの表示の検査により、候補免疫グロブリン配列の機能における残基の見込みある役割の分析、すなわち、候補免疫グロブリンがその抗原に結合する能力に影響を与える残基の分析が可能となる。このようにして、標的抗原（複数可）に対する増大した親和性などの、所望の抗体特徴が達成されるように、F R 残基をレシピエント配列及び輸入配列から選択し、組み合わせることができる。一般に、超可変領域残基は、抗原結合に影響を与えることに直接かつ最も実質的に関与している。

#### 【0181】

##### 3. ヒト抗体

本開示のヒト抗体は、ヒト由来ファージディスプレイライブラリーから選択された F v クローン可変ドメイン配列（複数可）を、上記のような既知のヒト定常ドメイン配列（複数可）と組み合わせることによって構築することができる。あるいは、本開示のヒトモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法によって作製することができる。ヒトモノクローナル抗体の產生用のヒト骨髓腫及びマウス - ヒトヘテロ骨髓腫細胞株は、例えば、Kozbor J. Immunol., 133: 3001 (1984)、Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)、及びBoerner et al., J. Immunol., 147: 86 (1991) によって記載されている。

#### 【0182】

現在、免疫化後に、内在性免疫グロブリン產生の非存在下で、ヒト抗体の完全レパートリーを產生することができるトランスジェニック動物（例えば、マウス）を產生することができる。例えば、キメラマウス及び生殖系列突然変異体マウスにおける抗体重鎖接合領域（J H）遺伝子のホモ接合性欠失が、内在性抗体の產生の完全な阻害をもたらすことが記載されている。そのような生殖系列突然変異体マウスにヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子アレイを移入することによって、抗原刺激後にヒト抗体の產生がもたらされる。例えば、Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551 (1993)、Jakobovits et al., Nature, 362: 255 (1993)、Bruggermann et al., Year in Immunol., 7: 33 (1993) を参照されたい。

#### 【0183】

遺伝子シャフリングを使用して、非ヒト、例えば、齧歯類の抗体からヒト抗体を得ることができ、この場合、ヒト抗体は、出発非ヒト抗体と同様の親和性及び特異性を有する。「エピトープインプリンティング」とも呼ばれるこの方法によって、本明細書に記載されるようなファージディスプレイ技術によって得られた非ヒト抗体断片の重鎖可変領域または軽鎖可変領域のどちらかをヒト V ドメイン遺伝子のレパートリーと置き換え、非ヒト鎖 / ヒト鎖の s c F v または F a b キメラの集団を創出する。抗原を用いた選択によって、非ヒト鎖 / ヒト鎖のキメラ s c F v または F a b の単離がもたらされ、この場合、ヒト鎖は、一次ファージディスプレイクローニング中の対応する非ヒト鎖を除去するときに破壊された抗原結合部位を回復する、すなわち、エピトープがヒト鎖パートナーの選択を支配する（刷り込む）。残りの非ヒト鎖を置き換えるためにこのプロセスを繰り返すと、ヒト抗体が得られる（1993年4月1日公開の PCT WO 93/06213 を参照されたい）。CDR 移植による非ヒト抗体の従来のヒト化とは異なり、この技術は、非ヒト起源の F R 残基も C D R 残基も有さない、完全にヒトの抗体を提供する。

#### 【0184】

##### 4. 二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも 2 つの異なる抗原に対する結合特異性を有するモノクローナル抗体である。特定の実施形態では、二重特異性抗体は、ヒトまたはヒト化抗体である。特定の実施形態では、結合特異性のうちの一方は S M O に対するものであり、もう一

10

20

30

40

50

方は任意の他の抗原に対するものである。特定の実施形態では、二重特異性抗体は、SMOの2つの異なるエピトープに結合することができる。二重特異性抗体を用いて、SMOを発現する細胞に細胞毒性剤を局在化させることもできる。これらの抗体は、SMO結合アーム、及び例えば、サポリン、抗インターフェロン-、ビンカアルカロイド、リシンA鎖、メトトレキサート、または放射性同位体ハプテンなどの、細胞毒性剤に結合するアームを保有する。二重特異性抗体は、完全長抗体または抗体断片（例えば、F(ab')<sub>2</sub>二重特異性抗体）として調製することができる。

【0185】

二重特異性抗体を作製する方法は当技術分野で既知である。従来、二重特異性抗体の組換え產生は、2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の共発現に基づいており、この場合、2つの重鎖は異なる特異性を有する (Milestone and Cuellio, *Nature*, 305: 537 (1983))。免疫グロブリン重鎖及び軽鎖のランダムな取り合わせのために、これらのハイブリドーマ（クアドローマ）は、10種の異なる抗体分子の潜在的な混合物を產生し、そのうちの1つしか正しい二重特異性構造を有しない。親和性クロマトグラフィーステップによって通常行なわれる正しい分子の精製はかなり面倒であり、生成物の収率は低い。同様の手順は、1993年5月13日公開のWO93/08829、及びTrauneker et al., *EMBO J.*, 10: 3655 (1991)に開示されている。

【0186】

異なる手法によれば、所望の結合特異性（抗体-抗原の結合部位）を有する抗体可変ドメインが、免疫グロブリン定常ドメイン配列と融合される。融合は、例えば、ヒンジ、CH2、及びCH3領域の少なくとも一部を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとのものである。特定の実施形態では、軽鎖結合に必要な部位を含む第1の重鎖定常領域（CH1）は、融合体のうちの少なくとも1つに存在する。免疫グロブリン重鎖融合体をコードするDNA、及び所望の場合、免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAを、別々の発現ベクターに挿入し、好適な宿主生物にコトランスクレプトする。これは、その構築で使用される不等比の3つのポリペプチド鎖が最適な収率をもたらす実施形態において、3つのポリペプチド断片の相互割合を調整する際の大きな自由度を提供する。しかしながら、等比の少なくとも2つのポリペプチド鎖の発現が高い収率をもたらす場合、または比が特に重要な場合は、2つまたは3つ全てのポリペプチド鎖のコード配列を1つの発現ベクターに挿入することが可能である。

【0187】

この手法の一実施形態では、二重特異性抗体は、一方のアーム中の第1の結合特異性を有するハイブリッド免疫グロブリン重鎖、及びもう一方のアーム中のハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖対（第2の結合特異性を提供する）から構成される。免疫グロブリン軽鎖が二重特異性分子の半分にしか存在しないことで、容易な分離方法が提供されるため、この非対称性構造が、不要な免疫グロブリン鎖の組み合せからの所望の二重特異性化合物の分離を容易にすることが分かった。この手法は、WO94/04690に開示されている。二重特異性抗体の精製のさらなる詳細については、例えば、Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986)を参照されたい。

【0188】

別の手法によれば、組換え細胞培養物から回収されるヘテロ二量体のパーセンテージを最大化するように、1対の抗体分子間の界面を操作することができる。界面は、抗体定常ドメインのCH3ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第1の抗体分子の界面からの1つ以上の小さなアミノ酸側鎖を、より大きな側鎖（例えば、チロシンまたはトリプトファン）で置き換える。大きなアミノ酸側鎖をより小さなもの（例えば、アラニンまたはトレオニン）で置き換えることによって、大きな側鎖（複数可）と同一または同等の大きさの代償的「空隙」を第2の抗体分子の界面上に創出する。これにより、ホモ二量体などの他の不要な最終生成物よりもヘテロ二量体の収率を増加させる機構が提供される

10

20

30

40

50

。

## 【0189】

二重特異性抗体には、架橋抗体または「ヘテロコンジュゲート」抗体が含まれる。例えば、ヘテロコンジュゲート中の抗体のうちの一方をアビシンと結合させ、もう一方をビオチンと結合させることができる。そのような抗体は、例えば、免疫系細胞を不要な細胞に標的化するために(米国特許第4,676,980号)、ならびにHIV感染を治療するために(WO91/00360、WO92/00373、及びEP03089)、提案されている。ヘテロコンジュゲート抗体は、任意の好都合な架橋方法を使用して作製し得る。好適な架橋剤は当技術分野で周知であり、いくつかの架橋技術とともに、米国特許第4,676,980号に開示されている。

10

## 【0190】

二重特異性抗体を抗体断片から作製する技術も文献中に記載されている。例えば、二重特異性抗体は化学結合を使用して調製することができる。Brennan et al., Science, 229: 81 (1985)は、インタクト抗体をタンパク質分解によって切断し、 $F(ab')断片を生成する手順を記載している。これらの断片は、ジチオール錯化剤である亜ヒ酸ナトリウムの存在下で還元されて、近接するジチオールを安定化し、分子間ジスルフィド形成を妨げる。その後、生成された $Fab'$ 断片をチオニトロベンゾエート(TNB)誘導体へと変換する。その後、メルカプトエチルアミンによる還元によって $Fab'$ -TNB誘導体のうちの1つを $Fab'$ -チオールへと再変換し、等モル量の他の $Fab'$ -TNB誘導体と混合して、二重特異性抗体を形成させる。生成される二重特異性抗体は、酵素の選択的固定のための薬剤として使用することができる。$

20

## 【0191】

最近の進歩により、 $Fab'$ -SH断片を大腸菌から直接回収することが容易となり、この $Fab'$ -SH断片を化学的に結合させて、二重特異性抗体を形成させることができる。Shalaby et al., J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992)は、完全にヒト化された二重特異性抗体 $F(ab')_2$ 分子の産生を記載している。各々の $Fab'$ 断片は、大腸菌から別々に分泌させられ、インビトロでの方向性のある化学結合に供されて、二重特異性抗体を形成した。このようにして形成された二重特異性抗体は、HER2受容体を過剰発現する細胞及び正常なヒトT細胞に結合するだけでなく、ヒト乳房腫瘍標的に対するヒト細胞傷害性リンパ球の溶解活性を誘発することもできた。

30

## 【0192】

二重特異性抗体断片を組換え細胞培養物から直接作製及び単離する様々な技術も記載されている。例えば、二重特異性抗体は、ロイシンジッパーを使用して産生されている。Kostelnik et al., J. Immunol., 148(5): 1547-1553 (1992)。Foss及びJunnタンパク質由来のロイシンジッパーペプチドが、遺伝子融合によって2つの異なる抗体の $Fab'$ 部分に連結させられた。この抗体ホモ二量体は、ヒンジ領域で還元されて単量体を形成し、その後、再び酸化されて抗体ヘテロ二量体を形成した。この方法は、抗体ホモ二量体の産生にも利用することができる。Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993)によって記載されている「ダイアボディー」技術は、二重特異性抗体断片を作製するための代替機構を提供している。この断片は、同じ鎖上の2つのドメイン間の対合を可能にするには短すぎるリンカーによって軽鎖可変ドメイン(VL)に接続された重鎖可変ドメイン(VH)を含む。したがって、1つの断片のVH及びVLドメインが、別の断片の相補的なVL及びVHドメインと対合することが強いられ、それにより、2つの抗原結合部位を形成する。単鎖Fv(sfv)二量体の使用によって二重特異性抗体断片を作製する別の戦略も報告されている。Gruber et al., J. Immunol., 152: 5368 (1994)を参照されたい。

40

## 【0193】

3つ以上の結合価を有する抗体が企図される。例えば、三重特異性抗体を調製すること

50

ができる。Tutt et al. J. Immunol. 147: 60 (1991)。

【0194】

5. 多価抗体

多価抗体は、抗体が結合する抗原を発現する細胞によって二価抗体よりも速く内在化（及び／または異化）されることができる。本開示の抗体は、3つ以上の抗原結合部位を有する（IgMクラス以外のものである）多価抗体（例えば、四価抗体）であることができる、これは、抗体のポリペプチド鎖をコードする核酸の組換え発現によって容易に產生させることができる。多価抗体は、二量体化ドメイン及び3つ以上の抗原結合部位を含むことができる。特定の実施形態では、二量体化ドメインは、Fc領域またはヒンジ領域を含む（または該領域からなる）。このシナリオでは、抗体は、Fc領域、及びFc領域のアミノ末端側の3つ以上の抗原結合部位を含む。特定の実施形態では、多価抗体は、3～約8個の抗原結合部位を含む（または該抗原結合部位からなる）。1つのそのような実施形態では、多価抗体は、4つの抗原結合部位を含む（または該抗原結合部位からなる）。多価抗体は、少なくとも1つのポリペプチド鎖（例えば、2つのポリペプチド鎖）を含み、該ポリペプチド鎖（複数可）は、2つ以上の可変ドメインを含む。例えば、ポリペプチド鎖（複数可）は、VD1 - (X1)<sub>n</sub> - VD2 - (X2)<sub>n</sub> - Fcを含んでもよく、ここで、VD1は第1の可変ドメインであり、VD2は第2の可変ドメインであり、FcはFc領域の1つのポリペプチド鎖であり、X1及びX2はアミノ酸またはポリペプチドを表し、nは0または1である。例えば、ポリペプチド鎖（複数可）は、VH - CH1 - 柔軟なリンカー - VH - CH1 - Fc領域の鎖、またはVH - CH1 - VH - CH1 - Fc領域の鎖を含んでもよい。本明細書中の多価抗体は、少なくとも2つ（例えば、4つ）の軽鎖可変ドメインポリペプチドをさらに含み得る。本明細書中の多価抗体は、例えば、約2～約8個の軽鎖可変ドメインポリペプチドを含み得る。ここで企図される軽鎖可変ドメインポリペプチドは、軽鎖可変ドメインを含み、任意にCLドメインをさらに含む。

10

20

30

40

50

【0195】

6. 単一ドメイン抗体

いくつかの実施形態では、本開示の抗体は、単一ドメイン抗体である。単一ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全てもしくは一部または軽鎖可変ドメインの全てもしくは一部を含む、単一のポリエプチド（polyepitide）鎖である。特定の実施形態では、単一ドメイン抗体は、ヒト単一ドメイン抗体である（Domainics, Inc., Waltham, MA、例えば、米国特許第6,248,516 B1号を参照）。一実施形態では、単一ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全てまたは一部からなる。

【0196】

7. 抗体変異体

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体のアミノ酸配列の修飾（複数可）が企図される。例えば、抗体の結合親和性及び／または他の生物学的特性を改善することが望ましい場合がある。抗体のアミノ酸配列変異体は、抗体をコードするヌクレオチド配列中に適切な変化を導入することによるか、またはペプチド合成によって調製し得る。そのような修飾には、例えば、抗体のアミノ酸配列内の残基からの欠失、及び／または該残基への挿入、及び／または該残基の置換が含まれる。最終的なコンストラクトが所望の特徴を保有するという条件で、最終的なコンストラクトに達するために、欠失、挿入、及び置換の任意の組み合せを行なうことができる。アミノ酸の変化は、対象抗体のアミノ酸配列を作製するときに、その配列中に導入してもよい。

【0197】

突然変異生成のための可能性のある場所である、抗体の特定の残基または領域を同定するための有用な方法は、Cunningham and Wells (1989) Science, 244: 1081 - 1085によって記載されているように、「アラニンスキヤニング突然変異生成」と呼ばれる。ここでは、標的残基の残基または基が同定され（例えば、arg、asp、his、lys、及びgluなどの荷電残基）、アミノ酸と抗原

との相互作用に影響を及ぼすために、中性のまたは負電荷を有するアミノ酸（例えば、アラニンまたはポリアラニン）に置き換えられている。その後、さらなる変異体またはその他の変異体を、置換部位にまたは置換部位の代わりに導入することによって、置換に対して機能的感受性を示すアミノ酸の場所を絞り込む。したがって、アミノ酸配列の変動を導入する部位は事前に決定されているが、突然変異の性質自体は事前に決定されている必要はない。例えば、所与の部位での突然変異の性能を分析するために、a 1 a スキャニングまたはランダム突然変異生成を標的コドンまたは標的領域で実施し、発現された免疫グロブリンを所望の活性についてスクリーニングする。

#### 【0198】

アミノ酸配列の挿入には、長さが1残基から100以上の残基を含むポリペプチドまでの範囲に及ぶアミノ末端及び/またはカルボキシル末端の融合、ならびに单一もしくは複数のアミノ酸残基の配列内挿入が含まれる。末端挿入の例には、N末端メチオニル残基を有する抗体が含まれる。抗体分子の他の挿入変異体には、抗体のN末端またはC末端と酵素（例えば、ADEPTのためのもの）または抗体の血清半減期を増大させるポリペプチドとの融合が含まれる。

#### 【0199】

特定の実施形態では、本開示の抗体を変化させて、抗体がグリコシル化される程度を増加または減少させる。ポリペプチドのグリコシル化は、通常、N-結合型またはO-結合型のいずれかである。N-結合型は、アスパラギン残基の側鎖への炭水化物部分の付着を指す。トリペプチド配列であるアスパラギン-X-セリン及びアスパラギン-X-トレオニン（Xは、プロリンを除く任意のアミノ酸である）は、アスパラギン側鎖への炭水化物部分の酵素的付着のための認識配列である。したがって、これらのトリペプチド配列のどちらかがポリペプチド中に存在することにより、潜在的なグリコシル化部位が創出される。O-結合型グリコシル化は、ヒドロキシアミノ酸、最も一般的には、セリンまたはトレオニンへの、糖であるN-アセイルガラクトサミン（acetylglucosamine）、ガラクトース、またはキシロースのうちの1つの付着を指すが、5-ヒドロキシプロリンまたは5-ヒドロキシリジンが使用される場合もある。

#### 【0200】

抗体に対するグリコシル化部位の付加または欠失は、上記の（N-結合型グリコシル化部位用の）トリペプチド配列のうちの1つ以上が創出または除去されるように、アミノ酸配列を変化させることによって、好都合に達成される。この変化は、（O-結合型グリコシル化部位については）もとの抗体の配列に対する1つ以上のセリンまたはトレオニン残基の付加、欠失、または置換によって行なうこともできる。

#### 【0201】

抗体がFc領域を含む場合、それに付着している炭水化物を変化させることができる。哺乳動物細胞によって產生されるネイティブ抗体は、通常、Fc領域のCH2ドメインのAsn297にN-結合によって通常付着させられる、分岐状のバイアンテナ型オリゴ糖を含む。例えば、Wright et al. (1997) TIBTECH 15:26-32を参照されたい。オリゴ糖には、様々な炭水化物、例えば、マンノース、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)、ガラクトース、及びシアル酸、ならびにバイアンテナ型オリゴ糖構造の「幹」のGlcNAcに付着したフコースが含まれ得る。いくつかの実施形態では、本開示の抗体中のオリゴ糖の修飾は、ある特定の改善された特性を有する抗体変異体を創出するために行ってもよい。

#### 【0202】

例えば、Fc領域に（直接的または間接的に）付着したフコースを欠く炭水化物構造を有する抗体変異体が提供される。そのような変異体は、改善されたADCC機能を有することができる。例えば、米国特許公開第US2003/0157108号（Presta, L.）、第US2004/0093621号（Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.）を参照されたい。「脱フコシル化」または「フコース欠損」抗体変異体に関連する出版物の例には：US2003/0157108、WO2000/6173

10

20

30

30

40

50

9、WO 2001/29246、US 2003/0115614、US 2002/0164328、US 2004/0093621、US 2004/0132140、US 2004/0110704、US 2004/0110282、US 2004/0109865、WO 2003/085119、WO 2003/084570、WO 2005/035586、WO 2005/035778、WO 2005/053742、WO 2002/031140、Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336: 1239-1249 (2004)、Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004) が含まれる。脱フコシル化抗体を產生することができる細胞株の例には、タンパク質のフコシル化に欠損がある Lec13 CHO 細胞 (Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249: 533-545 (1986)；特許出願第 US 2003/0157108 A1 号、Presta, L. 及び WO 2004/056312 A1、Adamsら、特に実施例 11)、ならびにノックアウト細胞株、例えば、アルファ-1, 6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子 FUT8 のノックアウト CHO 細胞 (例えば、Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)；Kanda, Y. et al. Biotechnol. Bioeng., 94 (4) : 680-688 (2006)；及び WO 2003/085107) が含まれる。

#### 【0203】

例えば、抗体の Fc 領域に付着したバイアンテナ型オリゴ糖が GlcNAc によって二分されている、バイセクト型 (bisected) オリゴ糖を有する抗体変異体がさらに提供される。そのような抗体変異体は、低下したフコシル化及び/または改善された ADC 機能を有し得る。そのような抗体変異体の例は、例えば、WO 2003/011878 (Jean-Mairetら)、米国特許第 6,602,684 号 (Umana ら)、及び US 2005/0123546 号 (Umana ら) に記載されている。Fc 領域に付着したオリゴ糖中に少なくとも 1 つのガラクトース残基を有する抗体変異体も提供される。そのような抗体変異体は、改善された CDC 機能を有することができる。そのような抗体変異体は、例えば、WO 1997/30087 (Pate ら)；WO 1998/58964 (Raju, S.)；及び WO 1999/22764 (Raju, S.) に記載されている。

#### 【0204】

特定の実施形態では、抗体変異体は、ADC をさらに改善する 1 つ以上のアミノ酸置換、例えば、Fc 領域の位置 298、333、及び/または 334 (Eu 残基付番) での置換を有する Fc 領域を含む。そのような置換は、上記の変動のいずれかと組み合わせて生じ得る。

#### 【0205】

特定の実施形態では、本開示は、全てではないが、いくつかのエフェクター機能を保有する抗体変異体を企図しており、このエフェクター機能のために、この抗体変異体は、抗体のインビボ半減期は重要であるが、ある特定のエフェクター機能 (例えば、補体及び ADC) は不必要または有害である多くの用途のための望ましい候補となる。特定の実施形態では、所望の特性だけが維持されていることを保証するために、抗体の Fc 活性を測定する。インビトロ及び/またはインビボの細胞傷害性アッセイを実施して、CDC 及び/または ADC 活性の低下/枯渇を確認することができる。例えば、Fc 受容体 (FcR) 結合アッセイを実施して、抗体が FcR 結合を欠く (したがって、おそらくは ADC 活性を欠く) が、FcRn 結合能力を保持することを保証することができる。ADC を媒介する主要な細胞である NK 細胞が Fc (RIII) のみを発現するのに対し、单球は、Fc (RI)、Fc (RII)、及び Fc (RIII) を発現する。造血細胞上での FcR の発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991) の 464 ページの表 3 に要約されている。関心の分子の ADC 活性を評価するためのインビトロアッセイの非限定的な例は、米国特許第 5,500,362 号 (例えば、Nat'l Acad. Sci. USA 83: 7059-70

10

20

30

40

50

63(1986)を参照)、及びHellstrom, I. et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502(1985)、5, 821, 337(Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361(1987)を参照)に記載されている。あるいは、非放射性アッセイ法を利用してよい(例えば、フローサイトメトリーについては、ACTI(商標)非放射性細胞傷害性アッセイ(Cell Technology, Inc. Mountaint View, CA、及びCytoTox 96(登録商標)非放射性細胞傷害性アッセイ(Promega, Madison, WI)を参照されたい)。そのようなアッセイのための有用なエフェクター細胞には、末梢血単核細胞(PBMC)及びナチュラルキラー(NK)細胞が含まれる。あるいは、またはさらに、関心の分子のADC活性は、インビボで、例えば、Clynes et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656(1998)に開示されているものなどの動物モデルで評価してもよい。また、C1q結合アッセイを実施して、抗体がC1qに結合することができず、したがって、CDC活性を欠くことを確認してもよい。補体活性化を評価するために、CDCアッセイを実施してもよい(例えば、Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163(1996)、Cragg, M. S. et al., Blood 101:1045-1052(2003)、及びCragg, M. S. and M. J. Glenrie, Blood 103:2738-2743(2004)を参照)。FcRn結合及びインビボクリアランス/半減期の決定を、当技術分野で既知の方法を使用して実施することもできる(例えば、Petkova, S. B. et al., Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769(2006)を参照)。

#### 【0206】

1つ以上のアミノ酸置換を有する他の抗体変異体が提供される。置換突然変異生成のための関心の部位には超可変領域が含まれるが、FRの変化も企図される。保存的置換は、「好ましい置換」という見出しで表1に示されている。「例示的な置換」と命名されたより実質的な変化は、表1に提供され、あるいはアミノ酸クラスに関連して以下にさらに記載される通りである。アミノ酸置換を関心の抗体中に導入し、産生物を、例えば、改善された抗原結合、減少した免疫原性、改善されたADCまたはCDCなどの所望の活性についてスクリーニングし得る。

10

20

30

【表1-1】

表1

もとの残基	例示的な置換	好ましい置換
A l a (A)	V a l 、 L e u 、 I l e	V a l
A r g (R)	L y s 、 G l n 、 A s n	L y s
A s n (N)	G l n 、 H i s 、 A s p 、 L y s 、 A r g	G l n
A s p (D)	G l u 、 A s n	G l u
C y s (C)	S e r 、 A l a	S e r
G l n (Q)	A s n 、 G l u	A s n
G l u (E)	A s p 、 G l n	A s p
G l y (G)	A l a	A l a
H i s (H)	A s n 、 G l n 、 L y s 、 A r g	A r g
I l e (I)	L e u 、 V a l 、 M e t 、 A l a 、 P h e 、 ノルロイシン	L e u

10

20

30

40

【表1-2】

L e u (L)	ノルロイシン、I l e 、 V a l 、 M e t 、 A l a 、 P h e	I l e
L y s (K)	A r g 、 G l n 、 A s n	A r g
M e t (M)	L e u 、 P h e 、 I l e	L e u
P h e (F)	T r p 、 L e u 、 V a l 、 I l e 、 A l a 、 T y r	
P r o (P)	A l a	A l a
S e r (S)	T h r	T h r
T h r (T)	V a l 、 S e r	S e r
T r p (W)	T y r 、 P h e	T y r
T y r (Y)	T r p 、 P h e 、 T h r 、 S e r	P h e
V a l (V)	I l e 、 L e u 、 M e t 、 P h e 、 A l a 、 ノルロイシン	L e u

【0207】

抗体の生物学的特性の修飾は、(a) 例えば、シートもしくはヘリックス立体構造としての置換領域中のポリペプチド骨格の構造、(b) 標的部位での分子の電荷もしくは疎水性、または(c) 側鎖の嵩高さに影響を及ぼす置換を選択することによって達成し得る。アミノ酸は、その側鎖の特性の類似性によって分類し得る (A. L. Lehninger, in Biochemistry, second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)) :

(1) 非極性: A l a (A)、V a l (V)、L e u (L)、I l e (I)、P r o (P)、P h e (F)、T r p (W)、M e t (M)

50

- (2) 非荷電極性: Gly (G)、Ser (S)、Thr (T)、Cys (C)、Tyr (Y)、Asn (N)、Gln (Q)
- (3) 酸性: Asp (D)、Glu (E)
- (4) 塩基性: Lys (K)、Arg (R)、His (H)

## 【0208】

あるいは、天然に存在する残基は、共通の側鎖特性に基づいてグループに分類し得る:

- (1) 疎水性: ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile;
- (2) 中性親水性: Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;
- (3) 酸性: Asp、Glu;
- (4) 塩基性: His、Lys、Arg;
- (5) 鎖の配向に影響を与える残基: Gly、Pro;
- (6) 芳香族: Trp、Tyr、Phe。

10

## 【0209】

非保存的置換は、これらのクラスのうちの1つのメンバーを別のクラスと交換することを伴う。また、そのような置換された残基は、保存的置換部位に、または残りの(非保存的)部位に導入してもよい。

## 【0210】

置換変異体の1つの種類は、親抗体(例えば、ヒト化抗体またはヒト抗体)の1つ以上の超可変領域残基の置換を含む。通常、さらなる開発のために選択された、得られた変異体(複数可)は、それらを作製した親抗体と比べて修飾された(例えば、改善された)生物学的特性を有する。例示的な置換変異体は、ファージディスプレイに基づく親和性成熟技術を使用して好都合に生成し得る、親和性成熟した抗体である。簡潔に述べると、いくつかの超可変領域部位(例えば、6~7個の部位)を突然変異させて、各々の部位で全ての可能なアミノ酸置換を生成させる。このようにして作製された抗体を、各々の粒子内にパッケージングされたファージコートタンパク質の少なくとも一部(例えば、M13の遺伝子IIIの産物)との融合体として、纖維状ファージ粒子からディスプレイさせる。その後、ファージディスプレイされた変異体を、その生物活性(例えば、結合親和性)についてスクリーニングする。修飾する候補超可変領域部位を同定するために、スキャニング突然変異生成(例えば、アラニンスキャニング)を行なって、抗原結合に顕著に寄与する超可変領域残基を同定することができる。あるいは、またはさらに、抗体と抗原の接触点を同定するために、抗原-抗体複合体の結晶構造を分析することが有益である場合がある。そのような接触残基及び隣接残基は、本明細書で詳述したものを含む当技術分野で既知の技術による置換の候補である。そのような変異体が生成されれば、変異体のパネルを、本明細書に記載したものを含む当技術分野で既知の技術を使用するスクリーニングに供し、1つ以上の関連するアッセイにおいて優れた特性を有する変異体を、さらなる開発のために選択することができる。

20

## 【0211】

抗体のアミノ酸配列変異体をコードする核酸分子は、当技術分野で既知の様々な方法によって調製される。これらの方法には、限定されないが、天然源からの単離(天然に存在するアミノ酸配列変異体の場合)、または以前に調製された抗体変異体もしくは非変異体型抗体のオリゴヌクレオチド媒介性(もしくは部位特異的)突然変異生成、PCR突然変異生成、及びカセット突然変異生成による調製が含まれる。

30

## 【0212】

本開示の抗体のFc領域中に1つ以上のアミノ酸修飾を導入し、それにより、Fc領域変異体を生成することが望ましい場合がある。Fc領域変異体は、ヒンジシステインのものを含む1つ以上のアミノ酸の位置でのアミノ酸修飾(例えば、置換)を含むヒトFc領域配列(例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4のFc領域)を含むことができる。

40

## 【0213】

本説明及び当技術分野の教示に従って、いくつかの実施形態では、本開示の抗体は、野

50

生型対応物の抗体と比較して、例えば、Fc領域中に1つ以上の変化を含み得ることが企図される。それでもなお、これらの抗体は、その野生型対応物と比較して、治療的有用性に必要な実質的に同じ特徴を保持する。例えば、WO 99/51642に記載されているような、変化した（すなわち、改善されたまたは減少した）C1q結合及び/または補体依存性細胞傷害（CDC）をもたらすある特定の変化を、例えば、Fc領域中で行なうことができると考えられる。Fc領域変異体の他の例に関するDuncan & Winter, *Nature* 322: 738-40 (1988)、米国特許第5,648,260号、米国特許第5,624,821号、及びWO 94/29351も参照されたい。WO 00/42072号（Presta）及びWO 2004/056312号（Lowman）は、FcRに対する改善されたまたは減少した結合を有する抗体変異体を記載している。これらの特許公開の内容は、参照により本明細書に具体的に組み込まれている。Shields et al. *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001)も参照されたい。増大した半減期、ならびに母親IgGの胎児への移行に関与する（Guyer et al., *J. Immunol.* 117: 587 (1976)、及びKim et al., *J. Immunol.* 24: 249 (1994)）新生児Fc受容体（FcRn）に対する改善された結合を有する抗体は、US 2005/0014934 A1号（Hintonら）に記載されている。これらの抗体は、Fc領域とFcRnとの結合を改善する1つ以上の置換を中心に有するFc領域を含む。変化したFc領域アミノ酸配列及び増大または減少したC1q結合能力を有するポリペプチド変異体は、米国特許第6,194,551 B1号、WO 99/51642に記載されている。これらの特許公開の内容は、参照により本明細書に具体的に組み込まれている。Idusogie et al. *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000)も参照されたい。  
10

#### 【0214】

別の態様では、本開示は、Fc領域を含むFcポリペプチドの界面に修飾を含む抗体を提供し、該修飾は、ヘテロ二量体化を容易にし、かつ/またはヘテロ二量体化を促進する。これらの修飾は、第1のFcポリペプチド内への隆起及び第2のFcポリペプチド内への空隙の導入を含み、この場合、隆起は、第1のFcポリペプチドと第2のFcポリペプチドの複合体形成を促進するように空隙中に配置可能である。これらの修飾を有する抗体を生成する方法は、例えば、米国特許第5,731,168号に記載されているように、当技術分野で既知である。  
20

#### 【0215】

さらに別の態様では、抗体の1つ以上の残基がシステイン残基で置換されている、システインを操作した抗体、例えば、「チオMAb」を創出することが望ましい場合がある。特定の実施形態では、置換された残基は、抗体の接近可能な部位で生じる。本明細書でさらに記載されているように、これらの残基をシステインと置換することによって、反応性チオール基がそれにより抗体の接近可能な部位に配置され、かつ該反応性チオール基を使用して、抗体を薬物部分またはリンカー-薬物部分などの他の部分にコンジュゲートさせ得る。ある特定の実施形態では、以下の残基：軽鎖のV205（Kabat付番）；重鎖のA118（EU付番）；及び重鎖Fc領域のS400（EU付番）のうちのいずれか1つ以上をシステインと置換してもよい。  
30

#### 【0216】

##### 8. 抗体誘導体

本開示の抗体を、当技術分野で既知であり、かつ容易に利用可能なさらなる非タンパク質部分を含むように、さらに修飾することができる。いくつかの実施形態では、抗体の誘導体化に好適な部分は水溶性ポリマーである。水溶性ポリマーの非限定的な例には、限定されないが、ポリエチレングリコール（PEG）、エチレングリコール/プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ-1,3-ジオキソラン、ポリ-1,3,6-トリオキサン、エチレン/無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸（ホモポリマーまたはランダ  
40

10

20

30

40

50

ムコポリマーのいずれか)、及びデキストランまたはポリ( *n* - ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、プロプロピレングリコールホモポリマー、プロリルプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール(例えば、グリセロール)、ポリビニルアルコール、ならびにそれらの混合物が含まれる。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、水中でのその安定性のために、製造上の利点を有し得る。ポリマーは任意の分子量であってもよく、分岐状または非分岐状であってもよい。抗体に付着したポリマーの数は様々に異なってもよく、2つ以上のポリマーが付着している場合、これらは同じまたは異なる分子であることができる。一般に、誘導体化に用いられるポリマーの数及び/または種類は、限定されないが、改善されるべき抗体の具体的な特性または機能、抗体誘導体が定義された条件下で治療に使用されるかどうかなどを含む検討事項に基づいて決定することができる。

10

### 【0217】

別の実施形態では、抗体と、放射線への曝露によって選択的に加熱し得る非タンパク質部分とのコンジュゲートが提供される。一実施形態では、非タンパク質部分はカーボンナノチューブである(Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102: 11600 - 11605 (2005))。放射線は、任意の波長であってもよく、限定されないが、通常の細胞に害を与えないが、抗体-非タンパク質部分の近くの細胞を死滅させる温度にまで非タンパク質部分を加熱する波長を含む。

20

### 【0218】

#### B. 抗体を作製するある特定の方法

##### 1. ある特定のハイブリドーマに基づく方法

本開示のモノクローナル抗体は、Kohler et al., Nature, 256: 495 (1975) によって最初に記載され、ヒト-ヒトハイブリドーマに関して、例えば、Hongo et al., Hybridoma, 14 (3): 253 - 260 (1995)、Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988)、Hammerling et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563 - 681 (Elsevier, N.Y., 1981)、及びNi, Xiandai Mianyixue, 26 (4): 265 - 268 (2006) にさらに記載されているハイブリドーマ法を使用して作製することができる。

30

### 【0219】

さらなる方法には、ハイブリドーマ細胞株からのモノクローナルヒト天然IgM抗体の产生に関して、例えば、米国特許第7,189,826号に記載されているものが含まれる。ヒトハイブリドーマ技術(トリオーマ技術)は、Vollmers and Brandlein, Histology and Histopathology, 20 (3): 927 - 937 (2005) 及びVollmers and Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27 (3): 185 - 91 (2005) に記載されている。

40

### 【0220】

様々な他のハイブリドーマ技術については、例えば、US 2006/258841、US 2006/183887(完全ヒト抗体)、US 2006/059575、US 2005/287149、US 2005/100546、US 2005/026229、ならびに米国特許第7,078,492号及び第7,153,507号を参照されたい。ハイブリドーマ法を使用してモノクローナル抗体を产生する例示的なプロトコルは、以下のように記載されている。一実施形態では、マウス、またはハムスターなどの他の適切な宿主動物を免疫化して、免疫化に使用されるタンパク質に特異的に結合する抗体を产生させるか、または产生することができるリンパ球を誘発させる。抗体は、突然変異体SMOまたはその断片を含むポリペプチド、及びモノホスホリル脂質A(MPL) / トレハロースジク

50

リノミコレート (dicrynomycolate) (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT) などのアジュvantの複数回の皮下 (s.c.) または腹腔内 (i.p.) 注射によって動物内で惹起させる。突然変異体SMOまたはその断片を含むポリペプチドは、その一部が本明細書にさらに記載されている、組換え法などの、当技術分野で周知の方法を使用して調製することができる。免疫化した動物由来の血清を抗突然変異体SMO抗体についてアッセイし、追加免疫を任意に投与する。抗突然変異体SMO抗体を产生する動物由来のリンパ球を単離する。あるいは、リンパ球をインビトロで免疫化してもよい。

## 【0221】

その後、ポリエチレングリコールなどの好適な融合剤を使用してリンパ球を骨髓腫細胞と融合させて、ハイブリドーマ細胞を形成させる。例えば、Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59 - 103 (Academic Press, 1986) を参照されたい。効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による安定した高レベルの抗体産生を支持し、HAT培地などの培地に感受性のある骨髓腫細胞を使用し得る。例示的な骨髓腫細胞には、限定されないが、Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA から入手可能なMOPC-21及びMPC-11マウス腫瘍、ならびにAmerican Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA から入手可能なSP-2またはX63-Ag8-653細胞に由来するものなどの、マウス骨髓腫株が含まれる。ヒトモノクローナル抗体の產生用のヒト骨髓腫及びマウス-ヒトヘテロ骨髓腫細胞株が説明されている (Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984)、Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51 - 63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987) )。

## 【0222】

このようにして調製したハイブリドーマ細胞を、好適な培養培地、例えば、融合していない親骨髓腫細胞の成長または生存を阻害する1つ以上の物質を含む培地中に播種し、成長させる。例えば、親骨髓腫細胞が酵素ヒポキサンチングアミニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HGPRT または Hprt) を欠く場合、ハイブリドーマの培養培地は、通常、ヒポキサンチン、アミノブテリン、及びチミジン (HAT培地) を含み、これらの物質は、HGPRT欠損細胞の成長を妨げる。いくつかの実施形態では、例えば、Even et al., Trends in Biotechnology, 24 (3), 105 - 108 (2006) に記載されているように、無血清ハイブリドーマ細胞培養法を使用して、胎仔ウシ血清などの動物由来血清の使用を減らす。

## 【0223】

ハイブリドーマ細胞培養物の生産性を改善するツールとしてのオリゴペプチドは、Franeck, Trends in Monoclonal Antibody Research, 111 - 122 (2005) に記載されている。具体的には、標準的な培養培地を特定のアミノ酸 (アラニン、セリン、アスパラギン、プロリン)、またはタンパク質加水分解物の画分で強化し、アポトーシスを、3 ~ 6アミノ酸残基から構成される合成オリゴペプチドによって顕著に抑制することができる。ペプチドは、ミリモル濃度またはそれよりも高い濃度で存在する。

## 【0224】

ハイブリドーマ細胞を成長させている培養培地を、突然変異体SMOに結合するモノクローナル抗体の產生についてアッセイし得る。ハイブリドーマ細胞によって產生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降によるか、またはラジオイムノアッセイ (RIA) もしくは酵素連結免疫吸着アッセイ (ELISA) などのインビトロ結合アッセイによって決定してもよい。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、スキヤッチャー

10

20

30

40

50

ド分析によって決定することができる。例えば、Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107: 220 (1980) を参照されたい。

【0225】

所望の特異性、親和性、及び／または活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞を同定した後、クローンを限界希釈手順によってサブクローニングし、標準的な方法によって成長させ得る。例えば、前出の Godling を参照されたい。この目的のための好適な培養培地には、例えば、D-MEM または RPMI-1640 培地が含まれる。さらに、ハイブリドーマ細胞は、動物内の腹水腫瘍としてインビオで成長させることができる。サブクローンによって分泌されたモノクローナル抗体は、例えば、プロテイン A - セファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、または親和性クロマトグラフィーなどの従来の免疫グロブリン精製手順によって、培養培地、腹水、または血清から好適に分離される。タンパク質をハイブリドーマ細胞から単離するための 1 つの手順は、US2005/176122 及び米国特許第 6,919,436 号に記載されている。この方法は、結合プロセスでリオトロピック塩などの最小限の塩を使用すること、いくつかの実施形態では、溶出プロセスで少量の有機溶媒も使用することを含む。

10

【0226】

2. ある特定のライプラリースクリーニング方法

本開示の抗体は、コンビナトリアルライブラーを使用して、所望の 1 つまたは複数の活性を有する抗体をスクリーニングすることによって作製することができる。例えば、ファージディスプレイライブラーを作製し、そのようなライブラーを所望の結合特徴を保有する抗体についてスクリーニングするための、様々な方法が当技術分野で既知である。そのような方法は、一般に、Hoogenboomら、Methods in Molecular Biology 178: 1 - 37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) に記載されている。例えば、関心の抗体を生成する 1 つの方法は、Lee et al., J. Mol. Biol. (2004), 340 (5): 1073 - 93 に記載されているようなファージ抗体ライブラーの使用によるものである。

20

【0227】

原理的に、合成抗体クローンは、ファージコートタンパク質に融合した抗体可変領域 (Fv) の様々な断片をディスプレイするファージを含むファージライブラーをスクリーニングすることによって選択される。そのようなファージライブラーは、所望の抗原に対する親和性クロマトグラフィーによってパニングされる。所望の抗原に結合することができる Fv 断片を発現するクローンは抗原に吸着させられ、したがって、ライブラー中の非結合クローンから分離される。その後、結合クローンを抗原から溶出させ、抗原の吸着／溶出のさらなるサイクルによってさらに濃縮することができる。本開示の抗体はいずれも、関心のファージクローンを選択するための好適な抗原スクリーニング手順を設計し、次いで、関心のファージクローン由来の Fv 配列、及び Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1 - 3 に記載の好適な定常領域 (Fc) 配列を使用して完全長抗体クローンを構築することによって得ることができる。

30

【0228】

ある特定の実施形態では、抗体の抗原結合ドメインは、どちらも 3 つの超可変ループ (HVR) または相補性決定領域 (CDR) を提示する、軽鎖 (VL) 及び重鎖 (VH) から各々 1 つずつの、約 110 アミノ酸の 2 つの可変 (V) 領域から形成される。可変ドメインは、VH 及び VL が短い柔軟なペプチドを介して共有結合している単鎖 Fv (scFv) 断片としてか、またはそれらが、各々定常ドメインに融合され、非共有結合的に相互作用する Fab 断片としてのどちらかで、ファージ上に機能的にディスプレイされることができ、これは、Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 1

40

50

2 : 433 - 455 (1994) に記載の通りである。本明細書で使用されるように、s c F v をコードするファージクローン及び F a b をコードするファージクローンは、「F v ファージクローン」または「F v クローン」と総称される。

【0229】

V H 及び V L 遺伝子のレパートリーをポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) によって別々にクローニングし、ファージライブラリー中でランダムに組換えることができ、その後、これを、抗原結合クローンについて検索することができ、これは、Winter et al. , Ann. Rev. Immunol. , 12 : 433 - 455 (1994) に記載の通りである。免疫化した供給源由来のライブラリーは、ハイブリドーマを構築する必要なく、免疫原に対する高親和性の抗体を提供する。あるいは、Griffiths et al. , EMBO J , 12 : 725 - 734 (1993) に記載されているような免疫化を全く用いることなく、ナイーブなレパートリーをクローニングして、広範囲の非自己及び自己抗原に対するヒト抗体の単一の供給源を提供することができる。最後に、ナイーブなライブラリーを、再編成されていない V 遺伝子セグメントを幹細胞からクローニングし、高度に可変性のある C D R 3 領域をコードするために、及びインビトロで再編成を達成するために、ランダムな配列を含む P C R プライマーを使用することによって、合成により作製することもでき、これは、Winter , J. Mol. Biol. , 227 : 381 - 388 (1992) に記載の通りである。

【0230】

ある特定の実施形態では、纖維状ファージを使用して、マイナーコートタンパク質 p I I I への融合によって抗体断片をディスプレイさせる。抗体断片は、例えば、Marks et al. , J. Mol. Biol. , 222 : 581 - 597 (1991) によって記載されているような、V H 及び V L ドメインが、柔軟なポリペプチドスペーサーによって同じポリペプチド鎖上で接続されている単鎖 F v 断片として、または例えば、Hoogenboom et al. , Nucl. Acids Res. , 19 : 4133 - 4137 (1991) によって記載されているような、一方の鎖が p I I I に融合され、もう一方が、野生型コートタンパク質の一部を置き換えることによって F a b - コートタンパク質の構造のアセンブリがファージ表面上にディスプレイされるようになる細菌宿主細胞ペリプラズム中に分泌される F a b 断片として、ディスプレイさせることができる。

【0231】

一般に、抗体遺伝子断片をコードする核酸は、ヒトまたは動物から回収された免疫細胞から得られる。抗突然変異体 S M O クローンが有利となるように偏ったライブラリーが望ましい場合、対象を突然変異体 S M O で免疫化して抗体応答を生じさせ、脾臓細胞及び/または循環 B 細胞、他の末梢血リンパ球 (P B L) をライブラリー構築のために回収する。好ましい実施形態では、抗突然変異体 S M O クローンが有利となるように偏ったヒト抗体遺伝子断片ライブラリーは、突然変異体 S M O 免疫化によって、突然変異体 S M O に対するヒト抗体を産生する B 細胞が生じるように、機能的ヒト免疫グロブリン遺伝子アレイを担持する（及び機能的内在性抗体産生系を欠く）トランスジェニックマウスにおいて抗突然変異体 S M O 抗体応答を生成させることによって得られる。ヒト抗体産生トランスジェニックマウスの生成は、以下に記載されている。

【0232】

抗突然変異体 S M O 反応性細胞集団のさらなる濃縮は、突然変異体 S M O 特異的な膜結合抗体を発現する B 細胞を単離するための好適なスクリーニング手順を使用することによって、例えば、突然変異体 S M O 親和性クロマトグラフィーを使用する細胞分離、または蛍光色素で標識した突然変異体 S M O への細胞の吸着と、それに続くフロー活性化セルソーティング (F A C S) によって得ることができる。

【0233】

あるいは、免疫化していないドナー由来の脾臓細胞及び/または B 細胞もしくは他の P B L の使用は、可能な抗体レパートリーのより良好な表示を提供し、突然変異体 S M O が抗原性でない任意の動物（ヒトまたは非ヒト）種を使用した抗体ライブラリーの構築も可

10

20

30

40

50

能にする。インビトロでの抗体遺伝子構築を組み込んだライブラリーについては、幹細胞を対象から回収して、再編成されていない抗体遺伝子セグメントをコードする核酸を提供する。関心の免疫細胞は、ヒト、マウス、ラット、ウサギ目、ルブリン (luprine) 、イヌ科、ネコ科、ブタ、ウシ、ウマ科、及びトリ種などの種々の動物種から得ることができる。

【0234】

抗体可変遺伝子セグメント (VH及びVLセグメントを含む) をコードする核酸を関心の細胞から回収し、増幅する。再編成されたVH及びVL遺伝子ライブラリーの場合、所望のDNAは、ゲノムDNAまたはmRNAをリンパ球から単離し、次いで、Orlandi et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 3833-3837 (1989) に記載されているように、再配列したVH及びVL遺伝子の5'及び3'末端に一致するプライマーを用いるポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって得ることができ、それにより、発現用の多様なV遺伝子レパートリーが作製される。V遺伝子は、Orlandi et al. (1989) 及びWard et al. , Nature, 341: 544-546 (1989) に記載されているように、成熟Vドメインをコードするエクソンの5'末端のバックプライマー、及びJセグメント内に基づくフォワードプライマーを用いて、cDNA及びゲノムDNAから増幅することができる。しかしながら、cDNAからの増幅については、バックプライマーが、Jones et al. , Biotechnol. , 9: 88-89 (1991) に記載されているようにリーダーエクソン中に、また、フォワードプライマーが、Sastry et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 5728-5732 (1989) に記載されているように定常領域内に基づくこともできる。相補性を最大化するために、Orlandiら (1989) またはSastryら (1989) に記載されているように、プライマー中に縮重を組み込むことができる。ある特定の実施形態では、ライブラリーの多様性は、免疫細胞核酸試料中に存在する全ての利用可能なVH及びVL配置を増幅するために、各々のV遺伝子ファミリーを標的としたPCRプライマーを用いることによって最大化し、これは、例えば、Marks et al. , J. Mol. Biol. , 222: 581-597 (1991) の方法に記載されているように、またはOrum et al. , Nucleic Acids Res. , 21: 4491-4498 (1993) の方法に記載されている通りである。増幅したDNAを発現ベクター内クローニングするために、稀少な制限部位を、Orlandiら (1989) に記載されているように、一方の末端でのタグとしてPCRプライマー中に、またはClackson et al. , Nature, 352: 624-628 (1991) に記載されているように、タグ付けしたプライマーを用いるさらなるPCR増幅によって導入することができる。

【0235】

合成によって再配列したV遺伝子のレパートリーは、インビトロでV遺伝子セグメントから得ることができる。ヒトVH遺伝子部分の大部分は、クローニング及びシーケンシングされており (Tomlinson et al. , J. Mol. Biol. , 227: 776-798 (1992) に報告されている) 、マッピングされており (Matsuda et al. , Nature Genet. , 3: 88-94 (1993) に報告されている) ; これらのクローニングされたセグメント (H1及びH2ループの全ての主要な立体構造を含む) を用いて、Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol. , 227: 381-388 (1992) に記載されているように、多様な配列及び長さのH3ループをコードするPCRプライマーを用いて、多様なVH遺伝子レパートリーを生成することができる。VHレパートリーは、全ての配列多様性を单一の長さの長いH3ループに集中させて作製することもでき、これは、Barbas et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457-4461 (1992) に記載されている通りである。ヒトV及びVセグメントはクローニング及びシーケンシングされており (Williams and Winter, Eur. J. I

10

20

30

40

50

mmunol., 23: 1456-1461 (1993) に報告されている)、該セグメントを使用して、合成軽鎖レパートリーを作製することができる。合成 V 遺伝子レパートリーは、様々な VH 及び VL のフォールド、ならびに L3 及び H3 の長さに基づいて、構造的にかなり多様な抗体をコードする。V 遺伝子をコードする DNA の増幅後、Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992) の方法に従って、生殖系列 V 遺伝子セグメントをインビトロで再配列することができる。

### 【0236】

抗体断片のレパートリーは、VH 及び VL 遺伝子レパートリーをいくつかの方法で一緒に組み合わせることによって構築することができる。各々のレパートリーを異なるベクター中に創出し、ベクターを、例えば、Hogrefe et al., Gene, 128: 119-126 (1993) に記載されているように、インビトロで、または例えば、Waterhouse et al., Nucl. Acids Res., 21: 2265-2266 (1993) に記載されている loxP 系などの、コンビナトリアル感染によってインビオで、組換えることができる。インビオ組換え手法では、大腸菌の形質転換の効率によって強いられるライプラリーの大きさの制限を克服するために、Fab 断片の二本鎖の性質が利用される。ナイーブの VH 及び VL レパートリーを、一方はファージミド中に、もう一方はファージベクター中に、別々にクローニングする。その後、各々の細胞が異なる組み合せを含み、ライプラリーの大きさが存在する細胞の数 (約  $10^{12}$  個のクローン) によってのみ制限されるように、2つのライプラリーをファージミド含有細菌のファージ感染によって組み合わせる。どちらのベクターも、VH 及び VL 遺伝子が単一のレプリコン上に組換えられ、ファージビリオン中に同時にパッケージングされるよう、インビオ組換えシグナルを含む。これらの巨大なライプラリーは、良好な親和性の多数の多様な抗体を提供する (約  $10^{-8}$  M の  $K_d^{-1}$ )。

10

20

30

### 【0237】

あるいは、レパートリーは、例えば、Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 7978-7982 (1991) に記載されているように、同じベクター中に連続的にクローニングするか、または例えば、Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991) に記載されているように、PCR によって1つにアセンブルし、その後、クローニングすることができる。PCR アセンブリを用いて、柔軟なペプチドスペーサーをコードする DNA を用いて VH DNA と VL DNA を結合させ、単鎖 Fv (scFv) レパートリーを形成させることもできる。さらに別の技法では、Embleton et al., Nucl. Acids Res., 20: 3831-3837 (1992) に記載されているように、「細胞内 PCR アセンブリ」を使用して、VH 遺伝子と VL 遺伝子とをリンパ球内で PCR によって組み合わせ、その後、連結された遺伝子のレパートリーをクローニングする。

### 【0238】

ナイーブのライプラリー (天然物または合成物のいずれか) によって產生された抗体は、中等度の親和性 (約  $10^6$  ~  $10^7$  M $^{-1}$  の  $K_d^{-1}$ ) であることができるが、親和性成熟は、前出の Winter ら (1994) に記載されているように、2次ライプラリーから構築及び再選択することによってインビトロで模倣することもできる。突然変異は、例えば、Hawkins et al., J. Mol. Biol., Biol., 226: 889-896 (1992) 226: 889-896 (1992) の方法または Gram et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 3576-3580 (1992) の方法において、エラープローンポリメラーゼ (Leung et al., Technique, 1: 11-15 (1989) に報告されている) を使用することによって、インビトロでランダムに導入することができる。さらに、親和性成熟は、例えば、関心の CDR にまたがるランダム配列を担持するプライマーを使用する PCR を用いて、1つ以上の CDR を、選択された個々の Fv クローンにおいてランダムに突然変異させ、より高い親和性のクローンについてスクリーニングすることによって行なう

40

50

ことができる。WO 96 077754 (1996年3月14日公開)は、免疫グロブリン軽鎖の相補性決定領域中の突然変異生成を誘導して、軽鎖遺伝子のライブラリーを創出する方法を記載している。別の有効な手法は、Marks et al., Biotechnol., 10: 779-783 (1992)に記載されているように、ファージディスプレイによって選択されたVHまたはVLドメインを、免疫化していないドナーから得られた天然に存在するVドメイン変異体のレパートリーと組換えて、数ラウンドの鎖再シャーフリングでより高い親和性についてスクリーニングすることである。この技術により、約10<sup>-9</sup> M以下の親和性を有する抗体及び抗体断片の產生が可能となる。

#### 【0239】

ライブラリーのスクリーニングは、当技術分野で既知の様々な技術によって達成することができる。例えば、突然変異体SMOは、吸着プレートのウェルをコーティングするために使用するか、吸着プレートに付着しているもしくはセルソーティングで使用される宿主細胞上で発現させるか、またはストレプトアビシンがコーティングされたビーズで捕捉するためにビオチンにコンジュゲートさせるか、またはファージディスプレイライブラリーをパニングするための任意の他の方法で使用することができる。

#### 【0240】

ファージライブラリー試料を、ファージ粒子の少なくとも一部を吸着剤と結合させるのに好適な条件下で、固定された突然変異体SMOと接触させる。通常、pH、イオン強度、温度などを含む条件は、生理的条件を模倣するように選択する。固相に結合したファージを洗浄し、次に酸で溶出させ、その後、例えばBarbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 7978-7982 (1991)に記載されているように酸によって、もしくは例えばMarks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)に記載されているようにアルカリによって、または例えばClackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991)の抗原競合法と同様の手順での突然変異体SMO抗原競合によって、溶出させる。ファージは、1回の選択ラウンドで20~1,000倍濃縮することができる。さらに、濃縮されたファージを細菌培養物中で成長させ、さらなる選択ラウンドに供することができる。

#### 【0241】

選択の効率は、洗浄時の解離の反応速度、及び単一のファージ上の複数の抗体断片が抗原と同時に触れることができるかどうかを含む、多くの因子によって決まる。速い解離反応速度（及び弱い結合親和性）を有する抗体は、短い洗浄、多価のファージディスプレイ、及び固相中の抗原の高いコーティング密度の使用によって保持することができる。高い密度は、多価の相互作用によってファージを安定化するだけでなく、解離したファージの再結合に有利に働きもする。遅い解離反応速度（及び良好な結合親和性）を有する抗体の選択は、Bass et al., Proteins, 8: 309-314 (1990)及びWO 92/09690に記載されているような長い洗浄及び一価のファージディスプレイ、ならびにMarks et al., Biotechnol., 10: 779-783 (1992)に記載されているような抗原の低いコーティング密度の使用によって促進することができる。

#### 【0242】

突然変異体SMOに対して、異なる親和性を有するファージ抗体を、親和性がわずかしか異なる場合であっても、選択することが可能である。しかしながら、（例えば、一部の親和性成熟技術で実施されているような）選択された抗体のランダム突然変異は、大半が抗原と結合し、わずかのものだけがより高い親和性を有する、多くの突然変異体を生じさせる可能性が高い。突然変異体SMOを制限すれば、稀少な高親和性のファージが競合して除去される可能性がある。全てのより高い親和性の突然変異体を保持するために、ファージを、過剰のビオチン化突然変異体SMOとインキュベーションすることができるが、ビオチン化突然変異体SMOは、突然変異体SMOの標的モル濃度親和性定数よりも低いモル濃度の濃度とする。その後、高親和性結合ファージを、ストレプトアビシンがコ

10

20

30

40

50

ーティングされた常磁性ビーズによって捕捉することができる。そのような「平衡捕捉」により、抗体を、わずか2倍しか高くない親和性を有する突然変異体クローニングより低い親和性を有する大過剰のファージから単離することを可能にする感度で、その結合の親和性に応じて選択することが可能となる。固相に結合したファージを洗浄する際に使用される条件を操作して、解離反応速度に基づいて識別することもできる。

【0243】

抗突然変異体SMOクローニングは、活性に基づいて選択することができる。ある特定の実施形態では、本開示は、GDC-0449耐性腫瘍細胞などの、突然変異体SMOを自然に発現する生細胞に結合する抗突然変異体SMO抗体を提供する。一実施形態では、本開示は、野生型SMO中のGDC-0449によって結合される領域と同じ領域に結合する抗突然変異体SMO抗体を提供する。そのような抗突然変異体SMO抗体に対応するFvクローニングは、(1)抗突然変異体SMOクローニングを上記のようなファージライブラリーから単離し、任意に、単離されたファージクローニングの集団を好適な細菌宿主中で成長させることによって、この集団を増幅すること；(2)それぞれ、それに対する遮断活性及び非遮断活性が望まれる突然変異体SMO及び第2のタンパク質を選択すること；(3)抗突然変異体SMOファージクローニングを固定された突然変異体SMOに吸着させること；(4)過剰の第2のタンパク質を用いて、第2のタンパク質の結合決定基と重複するかまたは該決定基と共有される突然変異体SMO結合決定基を認識する全ての望ましくないクローニングを溶出させること；ならびに(5)ステップ(4)の後に吸着したままであり続けるクローニングを溶出させることによって選択することができる。任意に、所望の遮断/非遮断性を有するクローニングを、本明細書に記載の選択手順を1回または複数回繰り返すことによってさらに濃縮することができる。

10

20

30

【0244】

本開示のハイブリドーマ由来モノクローナル抗体またはファージディスプレイFvクローニングをコードするDNAは、従来の手順を使用して(例えば、関心の重鎖及び軽鎖コード領域をハイブリドーマまたはファージDNA鑄型から特異的に増幅するように設計されたオリゴヌクレオチドプライマーを使用することによって)容易に単離及びシーケンシングされる。単離されれば、DNAを発現ベクターに入れ、その後、これを、トランスフェクトされなければ免疫グロブリンタンパク質を産生しない、大腸菌細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、または骨髄腫細胞などの宿主細胞内にトランスフェクトして、組換え宿主細胞内で所望のモノクローナル抗体の合成を得ることができる。抗体をコードするDNAの細菌内での組換え発現に関する総説の文献には、Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5:256(1993)、及びPluckthun, Immunol. Revs, 130:151(1992)が含まれる。

40

【0245】

完全長または部分長の重鎖及び/または軽鎖をコードするクローニングを形成させるために、本開示のFvクローニングをコードするDNAを、重鎖及び/または軽鎖定常領域をコードする既知のDNA配列と組み合わせることができる(例えば、適切なDNA配列を前出のKabatから得ることができる)。IgG、IgM、IgA、IgD、及びIgE定常領域を含む任意のアイソタイプの定常領域をこの目的のために使用することができること、ならびにそのような定常領域を任意のヒトまたは動物種から得ることができることが理解されるであろう。1つの動物(例えば、ヒト)種の可変ドメインDNAに由来し、その後、別の動物種の定常領域DNAと融合されて、「ハイブリッド」の完全長重鎖及び/または軽鎖のコード配列(複数可)を形成するFvクローニングが、本明細書で使用される「キメラ」及び「ハイブリッド」抗体の定義に含まれる。ある特定の実施形態では、ヒト可変DNAに由来するFvクローニングをヒト定常領域DNAに融合させて、完全長または部分長のヒト重鎖及び/または軽鎖のコード配列(複数可)を形成させる。

【0246】

本発明のハイブリドーマに由来する抗突然変異体SMO抗体をコードするDNAは(例

50

えば、Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81: 6851 - 6855 (1984) の方法と同様に) 例えは、ヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード配列をハイブリドーマクローンに由来する相同なマウス配列の代わりに用いることによって修飾することもできる。ハイブリドーマまたは Fv クローン由来の抗体または断片をコードする DNA は、免疫グロブリンコード配列に、非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の全てまたは一部を共有結合させることによって、さらに修飾することができる。このようにして、本開示の Fv クローンまたはハイブリドーマクローン由来抗体の結合特異性を有する「キメラ」または「ハイブリッド」抗体を調製する。

## 【0247】

## 3. ベクター、宿主細胞、及び組換え方法

10

抗体は、組換え方法を使用して產生させることもできる。抗突然変異体 SMO 抗体の組換え產生のために、抗体をコードする核酸を単離し、さらなるクローニング (DNA の増幅) 用または発現用の複製可能なベクターに挿入する。抗体をコードする DNA は、従来の手順を使用して (例えは、抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって) 容易に単離及びシーケンシングすることができる。多くのベクターが利用可能である。ベクター成分には、通常、限定されないが、以下のうちの 1 つまたは複数 : シグナル配列、複製起点、1 つ以上のマーカー遺伝子、エンハンサー要素、プロモーター、及び転写終結配列が含まれる。

## 【0248】

20

## a) シグナル配列成分

本開示の抗体は、直接的にだけでなく、異種ポリペプチドとの融合ポリペプチドとしても組換え產生させてもよく、この異種ポリペプチドは、いくつかの実施形態では、成熟タンパク質またはポリペプチドの N 末端に特異的な切断部位を有するシグナル配列または他のポリペプチドである。選択される異種シグナル配列は、いくつかの実施形態では、宿主細胞によって認識及びプロセッシングされる (すなわち、シグナルペプチダーゼによって切斷される) ものである。ネイティブ抗体のシグナル配列を認識及びプロセッシングしない原核宿主細胞について、シグナル配列は、例えは、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、1pp、または熱安定性エンテロトキシン I II リーダーの群から選択される原核生物シグナル配列によって置換される。酵母分泌のために、ネイティブシグナル配列は、例えは、酵母インベルターゼリーダー、因子リーダー (サッカロミセス属及びクルリベロミセス属の因子リーダーを含む)、もしくは酸ホスファターゼリーダー、C. アルビカンスのグルコアミラーゼリーダー、または WO 90/13646 に記載のシグナルによって置換され得る。哺乳動物細胞発現では、哺乳動物のシグナル配列及びウイルス分泌リーダー、例えは、単純ヘルペス gD シグナルが利用可能である。

30

## 【0249】

## b) 複製起点

40

発現ベクター及びクローニングベクターはいずれも、ベクターが 1 つ以上の選択された宿主細胞内で複製することを可能にする核酸配列を含む。通常、クローニングベクター中では、この配列は、ベクターが宿主の染色体 DNA とは独立して複製することを可能にするものであり、複製起点または自己複製配列が含まれる。そのような配列は、様々な細菌、酵母、及びウイルスについて周知である。プラスミド pBR322 由来の複製起点は、ほとんどのグラム陰性細菌に好適であり、2 μ プラスミド起点は酵母に好適であり、様々なウイルス起点 (SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、VSV、または BPV) は、哺乳動物細胞のクローニングベクターに有用である。通常、複製起点成分は、哺乳動物発現ベクターには必要ない (SV40 起点が典型的に使用され得るが、これは、単にそれが初期プロモーターを含有しているからに過ぎない)。

## 【0250】

## c) 選択遺伝子成分

50

発現ベクター及びクローニングベクターは、選択マーカーとも呼ばれる選択遺伝子を含

有し得る。典型的な選択遺伝子は、(a) 抗生物質もしくは他の毒素、例えば、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキサート、もしくはテトラサイクリンに対する耐性を付与するか、(b) 栄養要求性欠損を相補するか、または(c) 例えば、バチルス属のD-アラニンラセマーゼをコードする遺伝子のように、複合培地から利用可能でない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードする。

【0251】

選択スキームの1つの例では、宿主細胞の成長を停止させる薬物が利用される。異種遺伝子による形質転換が成功した細胞は、薬物耐性を付与するタンパク質を产生し、その結果、選択レジメンを切り抜けて生き残る。そのような優性選択の例では、薬物のネオマイシン、ミコフェノール酸、及びハイグロマイシンが使用される。

10

【0252】

哺乳動物細胞の好適な選択マーカーの別の例は、D H F R、グルタミンシンセターゼ(G S)、チミジンキナーゼ、メタロチオネイン-I及び-II、例えば、靈長類メタロチオネイン遺伝子、アデノシンデアミナーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼなどの、抗体をコードする核酸を取り込む能力を有する細胞の同定を可能にするものである。

【0253】

例えば、D H F R 遺伝子で形質転換された細胞は、形質転換体を、D H F R の競合的アンタゴニストであるメトトレキサート(M t x)を含む培養培地で培養することによって同定される。これらの条件下では、D H F R 遺伝子は、任意の他の共形質転換させた核酸とともに増幅される。内在性D H F R活性に欠損があるチャイニーズハムスター卵巣(C H O)細胞株(例えば、A T C C C R L - 9 0 9 6)を使用し得る。

20

【0254】

あるいは、G S 遺伝子で形質転換された細胞は、形質転換体を、G S の阻害剤であるL-メチオニンスルホキシミン(M s x)を含む培養培地で培養することによって同定される。これらの条件下では、G S 遺伝子は、任意の他の共形質転換させた核酸とともに増幅される。G S選択/増幅系は、上記のD H F R選択/増幅系と組み合わせて使用し得る。

【0255】

あるいは、関心の抗体、野生型D H F R 遺伝子、及びアミノグリコシド3'-ホスホトランスフェラーゼ(A P H)などの別の選択マーカーをコードするD N A配列で形質転換または共形質転換された宿主細胞(特に、内在性D H F Rを含む野生型宿主)は、アミノグリコシド抗生物質、例えば、カナマイシン、ネオマイシン、またはG 4 1 8などの選択マーカーの選択剤を含む培地中での細胞成長によって選択することができる。米国特許第4,965,199号を参照されたい。

30

【0256】

酵母で使用するための好適な選択遺伝子は、酵母プラスミドY R p 7に存在するt r p 1 遺伝子である(S t i n c h c o m b e t a l . , N a t u r e , 2 8 2 : 3 9 (1979))。t r p 1 遺伝子は、トリプトファン中で成長する能力を欠く酵母の突然変異体株、例えば、A T C C 番号4 4 0 7 6 またはP E P 4 - 1の選択マーカーを提供する。J o n e s , G e n e t i c s , 8 5 : 1 2 (1977)。したがって、酵母宿主細胞ゲノム中のt r p 1 障害の存在は、トリプトファンの非存在下における成長によって形質転換を検出する有効な環境を提供する。同様に、L e u 2 欠損酵母株(A T C C 2 0 , 6 2 2 または3 8 , 6 2 6)は、L e u 2 遺伝子を有する既知のプラスミドによって相補される。

40

【0257】

さらに、1.6 μm環状プラスミドp K D 1に由来するベクターをクリベロミセス属酵母の形質転換に使用することができる。あるいは、組換えウシキモシンの大規模産生のための発現系が、K . ラクチスについて報告された。V a n d e n B e r g , B i o / T e c h n o l o g y , 8 : 1 3 5 (1990)。クルイベロミセス属の工業用株による成熟組換えヒト血清アルブミンの分泌のための、安定な複数コピー発現ベクターも開示さ

50

れている。Fleer et al., Bio/Technology, 9: 968 - 975 (1991)。

【0258】

d) プロモーター成分

発現ベクター及びクローニングベクターは、通常、宿主生物によって認識され、抗体をコードする核酸に機能的に連結されているプロモーターを含む。原核生物宿主とともに使用するのに好適なプロモーターには、phoAプロモーター、-ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系、アルカリホスファターゼプロモーター、トリプトファン(trp)プロモーター系、ならびにtacプロモーターなどのハイブリッドプロモーターが含まれる。しかしながら、他の既知の細菌プロモーターが好適である。また、細菌系で使用するためのプロモーターは、抗体をコードするDNAに機能的に連結されたシャイン・ダルガノ(S.D.)配列も含む。

10

【0259】

プロモーター配列は真核生物について既知である。ほとんど全ての真核生物遺伝子は、転写が開始される部位からおよそ25~30塩基上流に位置するATリッチ領域を有する。多くの遺伝子の転写の始点から70~80塩基上流に見られる別の配列は、CNCATA領域(Nは、任意のヌクレオチドであり得る)である。ほとんどの真核生物遺伝子の3'末端には、コード配列の3'末端にポリAテールを付加するためのシグナルであり得るATAAAA配列がある。これらの配列は全て、真核生物発現ベクターに好適に挿入されている。

20

【0260】

酵母宿主とともに使用するための好適なプロモーター配列の例には、3'-ホスホグリセリン酸キナーゼ、またはエノラーゼ、グリセルアルデヒド-3'-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6'-リン酸イソメラーゼ、3'-ホスホグリセリン酸ムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、及びグルコキナーゼなどの他の糖分解酵素のプロモーターが含まれる。

20

【0261】

成長条件によって制御される転写のさらなる利点を有する誘導性プロモーターである他の酵母プロモーターは、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソチトクロムC、酸ホスファターゼ、窒素代謝と関連する分解性酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-3'-リン酸デヒドロゲナーゼ、ならびにマルトース及びガラクトースの利用に関する酵素のプロモーター領域である。酵母発現で使用するための好適なベクター及びプロモーターは、EP73, 657にさらに記載されている。酵母エンハンサーも酵母プロモーターとともに有利に使用される。

30

【0262】

哺乳動物宿主細胞内でのベクターからの抗体の転写は、例えば、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス(例えば、アデノウイルス2)、ウシパピローマウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス、サルウイルス40(SV40)などのウイルスのゲノムから、または異種哺乳動物プロモーター、例えば、アクチンプロモーターもしくは免疫グロブリンプロモーターから、熱ショックプロモーターから得られたプロモーターによって制御することができ、但し、そのようなプロモーターは、宿主細胞株と適合性がある。

40

【0263】

SV40ウイルスの初期及び後期プロモーターは、SV40ウイルス複製起点も含むSV40制限断片として好都合に得られる。ヒトサイトメガロウイルスの即初期プロモーターは、HindIII-E制限断片として好都合に得られる。ウシパピローマウイルスをベクターとして使用して哺乳動物宿主内でDNAを発現させる系は、米国特許第4,419,446号に開示されている。この系の修飾は、米国特許第4,601,978号に記載されている。単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼプロモーターの制御下での

50

マウス細胞におけるヒト - インターフェロンc DNAの発現に関する文献であるReyes et al., Nature 297: 598 - 601 (1982)も参照されたい。あるいは、ラウス肉腫ウイルスの長い末端反復をプロモーターとして使用することができる。

【0264】

e) エンハンサー要素成分

高等真核生物による、本開示の抗体をコードするDNAの転写は、多くの場合、エンハンサー配列をベクターに挿入することによって増加する。哺乳動物遺伝子について、多くのエンハンサー配列が現在知られている（グロビン、エラスター、アルブミン、-フェトプロテイン、及びインスリン）。しかしながら、通常、真核生物細胞ウイルス由来のエンハンサーが使用される。例として、複製起点の後期側のSV40エンハンサー（bp 100 ~ 270）、サイトメガロウイルス初期プロモーター、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー、及びアデノウイルスエンハンサーが含まれる。真核生物プロモーターを活性化させるためのエンハンサー要素に関しては、Yaniv, Nature 297: 17 - 18 (1982)も参照されたい。エンハンサーは、抗体をコードする配列の5'または3'側の位置でベクターに挿入されてもよいが、好ましくはプロモーターから5'側の部位に位置する。

10

【0265】

f) 転写終結成分

真核生物宿主細胞（酵母細胞、真菌細胞、昆虫細胞、植物細胞、動物細胞、ヒト細胞、または他の多細胞生物からの有核細胞）で使用される発現ベクターは、転写の終結及びmRNAの安定化に必要な配列も含む。そのような配列は、一般的に、真核生物またはウイルスのDNAまたはcDNAの5'及び場合によっては3'非翻訳領域から入手可能である。これらの領域は、抗体をコードするmRNAの非翻訳部分のポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含む。1つの有用な転写終結成分は、ウシ成長ホルモンポリアデニル化領域である。WO 94/11026号及びその中に開示されている発現ベクターを参照されたい。

20

【0266】

g) 宿主細胞の選択及び形質転換

本明細書中のベクター中のDNAをクローニングするか、または発現させるための好適な宿主細胞は、上記の原核生物、酵母、または高等真核生物の細胞である。この目的のための好適な原核生物には、グラム陰性またはグラム陽性生物などの真正細菌、例えば、腸内細菌科、例えば、エシェリキア属、例えば、大腸菌、エンテロバクター属、エルウェニア属、クレブシエラ属、プロテウス属、サルモネラ属、例えば、ネズミチフス菌、セラチア属、例えば、靈菌、及びシゲラ属、ならびにバチルス属、例えば、枯草菌及びB.リケニフォルミス（例えば、1989年4月12日に公開されたDD266, 710号に開示されているB.リケニフォルミス41P）、シュードモナス属、例えば、緑膿菌、及びストレプトミセス属が含まれる。1つの可能性のある大腸菌クローニング宿主は、大腸菌294（ATCC31, 446）であるが、大腸菌B、大腸菌X1776（ATCC31, 537）、及び大腸菌W3110（ATCC27, 325）などの他の株が好適である。これらの例は、限定的なものではなく、例示的なものである。

30

【0267】

完全長抗体、抗体融合タンパク質、及び抗体断片は、治療的抗体が、単独で腫瘍細胞の破壊における有効性を示す細胞毒性剤（例えば、毒素）にコンジュゲートされている場合などの、特にグリコシル化及びFcエフェクター機能が必要でない場合に、細菌内で産生させることができる。完全長抗体は、循環中でのより長い半減期を有する。大腸菌での産生は、より速くかつ費用効率がより高い。細菌での抗体断片及びポリペプチドの発現については、例えば、発現及び分泌を最適化するための翻訳開始領域（TIR）及びシグナル配列を記載している米国第5,648,237号（Carterら）、米国第5,789,199号（Jolyら）、米国第5,840,523号（Simmonsら）を参

40

50

照されたい。大腸菌内での抗体断片の発現を記載している Charlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254も参照されたい。発現後、抗体を可溶性画分中の大腸菌細胞ペーストから単離してもよく、また、例えば、アイソタイプに応じてプロテインAまたはプロテインGカラムに通して精製することができる。最終精製は、例えば、CHO細胞で発現された抗体を精製するプロセスと同様に実施することができる。

【0268】

原核生物に加え、糸状菌または酵母などの真核微生物は、抗体をコードするベクターのための好適なクローニングまたは発現宿主である。出芽酵母、または一般的なパン酵母が、下等真核生物宿主微生物の中で最も一般的に使用されている。しかしながら、いくつかの他の属、種、及び株が一般に利用可能かつ本明細書で有用であり、分裂酵母；例えば、K.ラクチス、K.フラギリス(ATCC 12,424)、K.ブルガリクス(ATCC 16,045)、K.ウイックラミイ(wickeramii)(ATCC 24,178)、K.ワルティ(ATCC 56,500)、K.ドロソフィラルム(ATCC 36,906)、K.サーモトレランス、及びK.マルキシアヌスなどのクルイベロミセス属宿主；ヤロウイア属(EP 402,226号)；ピキア・パストリス(EP 183,070)；カンジダ属；トリコデルマ・レエシア(EP 244,234)；アカパンカビ；シュワニオミセス・オクシデンタリスなどのシュワニオミセス属；例えば、ニューロスボラ属、ペニシリウム属、トリポクラディウム属などの糸状菌、ならびに偽巣性コウジ菌及びクロコウジカビなどのアスペルギルス属宿主などがある。治療的タンパク質の产生のための酵母及び糸状菌の使用を考察している総説については、例えば、Gerngross, Nat. Biotech. 22: 1409-1414 (2004)を参照されたい。

10

20

30

【0269】

グリコシリ化経路が「ヒト化」されており、結果として、部分的にまたは完全にヒトのグリコシリ化様式を有する抗体の产生がもたらされる、特定の真菌及び酵母株を選択することができる。例えば、Li et al., Nat. Biotech. 24: 210-215 (2006) (ピキア・パストリスのグリコシリ化経路のヒト化を記載している)、及び前出のGerngrossらを参照されたい。

【0270】

グリコシリ化された抗体の発現のための好適な宿主細胞は、多細胞生物（無脊椎動物及び脊椎動物）にも由来する。無脊椎動物細胞の例には、植物及び昆虫細胞が含まれる。数々のバキュロウイルス株及び変異体、ならびにヨトウガ（毛虫）、ネッタイシマカ（蚊）、ヒトスジシマカ（蚊）、キイロショウジョウバエ（ショウジョウバエ）、及びカイコなどの宿主由来の対応する許容される昆虫宿主細胞が同定されている。トランスフェクションのための種々のウイルス株、例えば、オートグラファ・カリフォルニカNPVのL-1変異体及びカイコNPVのBm-5株が公的に利用可能であり、そのようなウイルスを、特に、ヨトウガ細胞のトランスフェクションのための、本開示による本明細書中のウイルスとして使用し得る。

【0271】

綿、トウモロコシ、ジャガイモ、大豆、ペチュニア、トマト、ウキクサ（ウキクサ科）、アルファルファ（タルウマゴヤシ）、及びタバコの植物細胞培養物を宿主として利用することもできる。例えば、米国特許第5,959,177号、第6,040,498号、第6,420,548号、第7,125,978号、及び第6,417,429号（トランスジェニック植物中で抗体を產生させるためのPLANTIBODIES（商標）技術を記載している）を参照されたい。

40

【0272】

脊椎動物細胞を宿主として使用してもよく、培養（組織培養）での脊椎動物細胞の繁殖は慣習的手順となっている。有用な哺乳動物宿主細胞株の例は、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株(COS-7、ATCC CRL 1651)；ヒト胚性腎臓

50

株（浮遊培養での成長のためにサブクローニングされた 293 または 293 細胞、Graham et al., J. Gen. Virol. 36: 59 (1977)）；ベビーハムスター腎臓細胞（BHK、ATCC CCL 10）；マウスセルトリ細胞（TM4、Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980)）；サル腎臓細胞（CV1、ATCC CCL 70）；アフリカミドリザル腎臓細胞（VERO-76、ATCC CRL-1587）；ヒト子宮頸癌細胞（HELA、ATCC CCL 2）；イヌ腎臓細胞（MDCK、ATCC CCL 34）；バッファローラット肝臓細胞（BRL 3A、ATCC CRL 1442）；ヒト肺細胞（W138、ATCC CCL 75）；ヒト肝臓細胞（Hep G2、HB 8065）；マウス乳腺腫瘍（MMT 060562、ATCC CCL 51）；TRI細胞（Mather et al., Annals N. Y. Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)）；MRC5 細胞；FS4 細胞；及びヒト肝細胞癌株（Hep G2）である。他の有用な哺乳動物宿主細胞株には、DHFR-CHO 細胞を含むチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞（Ur laub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)）；ならびにNS0 及びSp2/0などの骨髄腫細胞株が含まれる。抗体産生に好適な特定の哺乳動物宿主細胞株の総説については、例えば、Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 255-268 を参照されたい。

10

20

30

40

50

## 【0273】

宿主細胞を、抗体産生用の上記の発現またはクローニングベクターで形質転換し、プロモーターを誘導するか、形質転換体を選択するか、または所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために必要に応じて修飾された従来の栄養培地中で培養する。

## 【0274】

## h)宿主細胞の培養

本開示の抗体を産生させるために使用される宿主細胞は、種々の培地中で培養することができる。ハムの F10 (Sigma)、最小必須培地 ((MEM)、(Sigma)、RPMI-1640 (Sigma)、及びダルベッコ改変イーグル培地 ((DMEM)、Sigma)などの市販の培地が、宿主細胞を培養するのに好適である。さらに、Ham et al., Meth. Enz. 58: 44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102: 255 (1980)、米国特許第4,767,704号、第4,657,866号、第4,927,762号、第4,560,655号、もしくは第5,122,469、WO90/03430、WO87/00195、または米国再発行特許第30,985号に記載の培地のうちのいずれかを、宿主細胞用の培養培地として使用してもよい。これらの培地のうちのいずれかに、必要に応じて、ホルモン及び/または他の成長因子（例えば、インスリン、トランスフェリン、もしくは上皮成長因子）、塩（例えば、塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、及びリン酸塩）、バッファー（例えば、HEPES）、ヌクレオチド（例えば、アデノシン及びチミジン）、抗生物質（例えば、GENTAMYCIN（商標）薬）、微量元素（通常マイクロモル濃度範囲の最終濃度で存在する無機化合物と定義される）、ならびにグルコースまたは同等のエネルギー源を補充することができる。任意の他の必要な補助物質を当業者に知られる適切な濃度で含めることもできる。例えば、温度、pHなどの培養条件は、発現用に選択される宿主細胞とともにこれまでに使用されているものであり、当業者には明らかであろう。

## 【0275】

## i)抗体の精製

組換え技術を使用する場合、抗体は、細胞内、ペリプラズム空間で産生されるか、または培地中に直接分泌され得る。抗体が細胞内で産生される場合、最初のステップとして、宿主細胞または溶解断片のどちらかの微粒子残屑を、例えば、遠心分離または限外濾過によって除去する。Carter et al., Bio/Technology 10:

163-167(1992)は、大腸菌のペリプラズム空間に分泌される抗体を単離する手順を記載している。簡潔に述べると、細胞ペーストを、酢酸ナトリウム(pH3.5)、EDTA、及びフッ化フェニルメチルスルホニル(PMSF)の存在下で、約30分間かけて解凍する。細胞残屑は遠心分離によって除去することができる。抗体が培地中に分泌される場合、そのような発現系からの上清を、通常、市販のタンパク質濃縮フィルター、例えば、AmiconまたはMillipore Pallicon限外濾過ユニットを使用してまず濃縮する。PMSFなどのプロテアーゼ阻害剤を前述のステップのうちのいずれかに含めてタンパク質分解を阻害してもよく、また、抗生物質を含めて外来性汚染菌の成長を防止してもよい。

## 【0276】

10

細胞から調製された抗体組成物は、例えば、ヒドロキシルアバタイトクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、及び親和性クロマトグラフィーを使用して精製することができる。親和性リガンドとしてのプロテインAの好適性は、抗体中に存在する任意の免疫グロブリンFcドメインの種及びアイソタイプによって決まる。プロテインAは、ヒト1、2、または4重鎖に基づく抗体を精製するためには使用することができる(Lindmark et al., J. Immunol. Method. 62: 1-13(1983))。タンパク質Gは、全てのマウスアイソタイプ及びヒト3に推奨される(Guss et al. (1986) EMBO J. 5: 1567-1575)。親和性リガンドが付着しているマトリックスは、ほとんどの場合、アガロースであるが、他のマトリックスが利用可能である。コントロールドポアガラスまたはポリ(スチレンジビニル)ベンゼンなどの機械的に安定なマトリックスは、アガロースで達成できるよりも速い流速及び短い処理時間を可能にする。抗体がC<sub>H</sub>3ドメインを含む場合、Bakerbond ABX(商標)樹脂(J.T. Baker, Phillipsburg, NJ)が精製に有用である。イオン交換カラム上での画分、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカ上でのクロマトグラフィー、ヘパリンSEPHAROSE(商標)上でのクロマトグラフィー、陰イオン交換樹脂または陽イオン交換樹脂(例えば、ポリアスパラギン酸カラム)上でのクロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、及び硫安塩析などの他のタンパク質精製技術も、回収される抗体に応じて利用可能である。

20

## 【0277】

30

任意の予備的精製工程(複数可)の後、関心の抗体及び夾雜物を含む混合物を、約2.5~4.5のpHの溶出バッファーを使用する、いくつかの実施形態では、低塩濃度(例えば、約0~0.25Mの塩)で行なわれる、低pH疎水性相互作用クロマトグラフィーに供し得る。

## 【0278】

一般に、研究、試験、及び臨床で使用するための抗体を調製する様々な方法は、当技術分野で十分に確立され、上記の方法と一致しており、かつ/または当業者によって関心の特定の抗体に適切であるとみなされる。

## 【0279】

40

## C. 免疫コンジュゲート

本開示はまた、化学療法剤、薬物、成長阻害因子、毒素(例えば、タンパク質毒素、細菌、真菌、植物、もしくは動物起源の酵素活性毒素、またはそれらの断片)、あるいは放射性同位体(すなわち、放射性コンジュゲート)などの、1つ以上の細胞毒性剤にコンジュゲートされた抗体を含む免疫コンジュゲート(「抗体-薬物コンジュゲート」または「ADC」と互換的に呼ばれる)を提供する。

## 【0280】

免疫コンジュゲートは、癌の治療において、細胞毒性剤、すなわち、細胞の成長または増殖を中止または阻害する薬物の局所送達に使用されている(Lambert, J. (2005) Curr. Opinion in Pharmacology 5: 543-549, Wu et al (2005) Nature Biotechnology 23

50

(9) : 1137-1146、Payne, G. (2003) i 3: 207-212、Syrigos and Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19: 605-614、Niculescu-Duvaz and Springer (1997) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 26: 151-172、米国特許第4,975,278号)。コンジュゲートされていない薬物の全身投与が、正常細胞及び排除しようとしている腫瘍細胞に対して許容されないレベルの毒性をもたらし得る場合、免疫コンジュゲートは、腫瘍への薬物部分の標的送達、及びその中の細胞内蓄積を可能にする (Baldwin et al., *Lancet* (Mar. 15, 1986) pp. 603-05、Thorpe (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in *Monoclonal Antibodies' 84: Biological And Clinical Applications* (A. Pinchera et al., eds) pp. 475-506。ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体はどちらも、これらの戦略において有用であると報告されている (Rowland et al., (1986) *Cancer Immunol. Immunother.* 21: 183-87)。これらの方法で使用される薬物には、ダウノマイシン、ドキソルビシン、メトトレキサート、及びビンデシンが含まれる (前出のRowlandら (1986))。抗体-毒素コンジュゲートで使用される毒素には、ジフテリア毒素などの細菌毒素、リシンなどの植物毒素、ゲルダナマイシン (Mandler et al (2000) *J. Nat. Cancer Inst.* 92 (19): 1573-1581、Mandler et al (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10: 1025-1028、Mandler et al (2002) *Bioconjugate Chem.* 13: 786-791)、メイタンシノイド (EP 1391213号; Liu et al., (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8618-8623)、及びカリケアマイシン (Lode et al (1998) *Cancer Res.* 58: 2928、Hinman et al (1993) *Cancer Res.* 53: 3336-3342)などの小分子毒素が含まれる。毒素は、チューブリン結合、DNA結合、またはトポイソメラーゼ阻害を含む機構によってその細胞毒性効果を発揮し得る。細胞毒性薬の中には、大きい抗体またはタンパク質受容体リガンドにコンジュゲートされた場合、不活性になるかまたは活性が弱くなる傾向にあるものもある。

### 【0281】

ZEVALIN (登録商標) (イブリツモマブチウキセタン、Biogen / Idec) は、正常Bリンパ球及び悪性Bリンパ球の表面に見られるCD20抗原に向けられたマウスIgG1カッパモノクローナル抗体とチオ尿素リンカー-キレート剤によって結合された111Inまたは90Y放射性同位体とから構成される抗体-放射性同位体コンジュゲートである (Wiseman et al (2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27 (7): 766-77、Wiseman et al (2002) *Blood* 99 (12): 4336-42、Witzig et al (2002) *J. Clin. Oncol.* 20 (10): 2453-63、Witzig et al (2002) *J. Clin. Oncol.* 20 (15): 3262-69)。ZEVALINは、B細胞非ホジキンリンパ腫 (NHL) に対する活性を有するが、投与は、ほとんどの患者において重篤かつ持続的な血球減少をもたらす。カリケアマイシンに連結されたhuCD33抗体から構成される抗体-薬物コンジュゲートである、MYLOTARG (商標) (ゲムツズマブオゾガマイシン、Wyeth Pharmaceuticals) は、2000年に、注射による急性骨髓性白血病の治療用に承認された (Drugs of the Future (2000) 25 (7): 686、米国特許第4970198号、第5079233号、第5585089号、第5606040号、第5693762号、第5739116号、第5767285号、第5773001号)。ジスルフィドリンカースPを介してメイタンシノイド薬物部分DM1に連結されたhuC242抗体から構成され

る抗体・薬物コンジュゲートである、カンツズマブメルタンシン (Immunogen, Inc.) は、結腸癌、膀胱癌、胃癌、及び他の癌などの、CanAgを発現する癌の治療のために、第II相治験に進んでいる。メイタンシノイド薬物部分DM1に連結された抗前立腺特異的膜抗原 (PSMA) モノクローナル抗体から構成される抗体・薬物コンジュゲートである、MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.) は、前立腺腫瘍の潜在的治療のために開発中である。アウリスタチンペプチドのアウリスタチンE (AE)、及びドラスタチンの合成類似体であるモノメチルアウリスタチン (MMAE) がキメラモノクローナル抗体cBR96 (上皮癌表面のルイスYに特異的) 及びcAC10 (血液学的悪性腫瘍表面のCD30に特異的) にコンジュゲートされ (Doronina et al (2003) *Nature Biotechnology* 21 (7) : 778-784)、治療用に開発中である。

#### 【0282】

ある特定の実施形態では、免疫コンジュゲートは、抗体及び化学療法剤または他の毒素を含む。免疫コンジュゲートの作製に有用な化学療法剤が本明細書に記載されている (例えば、上記)。使用可能な酵素活性毒素及びその断片には、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合性活性断片、外毒素A鎖 (緑膿菌由来)、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシンA鎖、アルファ-サルシン、シナアブラギリタンパク質、ジアンチンタンパク質、フィトラカ・アメリカーナ (Phytolaca americana) タンパク質 (PAPI、PAPII、及びPAP-S)、ニガウリ阻害剤、クルシン、クロチン、サパオナリア・オフィシナリス (sapoanaria officinalis) 阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、及びトリコテセンが含まれる。例えば、1993年10月28日に公開されたWO93/21232号を参照されたい。様々な放射性核種が、放射性コンジュゲートされた抗体の产生のために利用可能である。例としては、<sup>212</sup>Bi、<sup>131</sup>I、<sup>131</sup>In、<sup>90</sup>Y、及び<sup>186</sup>Reが挙げられる。抗体と細胞毒性剤のコンジュゲートは、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルチオール)プロピオネート (SPDP)、イミノチオラン (IT)、イミドエステルの二官能性誘導体 (例えば、ジメチルアジピミデートHC1)、活性エステル (例えば、スペリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド (例えば、グルタルアルデヒド)、ビス-アジド化合物 (例えば、ビス (p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体 (例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン)、ジイソシアネート (例えば、トルエン2,6-ジイソシアネート)、及びビス-活性フッ素化合物 (例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)などの様々な二官能性タンパク質結合剤を使用して作製される。例えば、リシン免疫毒素は、Vittetta et al., *Science*, 238:1098 (1987) に記載されているように調製することができる。炭素-14標識した1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸 (MX-DTPA) は、放射性ヌクレオチドを抗体にコンジュゲートさせるための例示的なキレート化剤である。WO94/11026を参照されたい。

#### 【0283】

抗体と、カリケアマイシン、メイタンシノイド、ドラスタチン、アウロスタチン、トリコテセン、及びCC1065、ならびに毒素活性を有するこれらの毒素の誘導体などの、1つ以上の小分子毒素とのコンジュゲートも本明細書で企図される。

#### 【0284】

##### 1. メイタンシン及びメイタンシノイド

いくつかの実施形態では、免疫コンジュゲートは、1つ以上のメイタンシノイド分子にコンジュゲートされた抗体 (完全長または断片) を含む。

#### 【0285】

メイタンシノイドは、チューブリン重合を阻害することによって作用する有糸分裂 (mitotic) 阻害剤である。メイタンシンは、東アフリカの低木メイテナス・セラ

10

20

30

40

40

50

タから最初に単離された（米国特許第3,896,111号）。その後、特定の微生物も、メイタンシノール及びC-3メイタンシノールエステルなどのメイタンシノイドを產生することが判明した（米国特許第4,151,042号）。合成メイタンシノールならびにその誘導体及び類似体は、例えば、米国特許第4,137,230号、第4,248,870号、第4,256,746号、第4,260,608号、第4,265,814号、第4,294,757号、第4,307,016号、第4,308,268号、第4,308,269号、第4,309,428号、第4,313,946号、第4,315,929号、第4,317,821号、第4,322,348号、第4,331,598号、第4,361,650号、第4,364,866号、第4,424,219号、第4,450,254号、第4,362,663号、及び第4,371,533に開示されている。  
10

#### 【0286】

メイタンシノイド薬物部分は、(i)発酵または化学修飾、発酵産物の誘導体化によって調製するために比較的利用しやすく、(ii)非ジスルフィドリンカーを介した抗体へのコンジュゲーションに好適な官能基を用いた誘導体化に適しており、(iii)血漿中で安定であり、かつ(iv)種々の腫瘍細胞株に対して効果的であるので、それらは、抗体薬物コンジュゲート中の魅力的な薬物部分である。

#### 【0287】

メイタンシノイドを含有する免疫コンジュゲート、その作製方法、及びその治療的使用は、例えば、その開示が参照により本明細書に明示的に組み込まれる、米国特許第5,208,020号、第5,416,064号、及び欧洲特許EPO 425 235 B1号に開示されている。Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8618-8623 (1996)は、ヒト結腸直腸癌に向けられたモノクローナル抗体C242に連結されたDM1と命名されたメイタンシノイドを含む免疫コンジュゲートを記載している。このコンジュゲートは、培養結腸癌細胞に対して細胞毒性が高いことが見出され、インビオ腫瘍成長アッセイにおいて抗腫瘍活性を示した。Chari et al., Cancer Research 52: 127-131 (1992)は、メイタンシノイドが、ジスルフィドリンカーを介して、ヒト結腸癌細胞株上の抗原に結合するマウス抗体A7、またはHER-2/neu癌遺伝子に結合する別のマウスモノクローナル抗体TA.1にコンジュゲートされた免疫コンジュゲートを記載している。TA.1-メイタンシノイドコンジュゲートの細胞毒性は、1細胞当たり $3 \times 10^5$ 個のHER-2表面抗原を発現するヒト乳癌細胞株SK-BR-3に対してインビトロで試験された。薬物コンジュゲートは、遊離メイタンシノイド薬物と同様の程度の細胞毒性を達成し、これは、抗体1分子当たりのメイタンシノイド分子の数を増加させることによって増加させることができた。A7-メイタンシノイドコンジュゲートはマウスで低い全身細胞毒性を示した。  
20  
30  
30

#### 【0288】

抗体-メイタンシノイドコンジュゲートは、抗体またはメイタンシノイド分子のどちらの生物活性も顕著に減少させずに、抗体をメイタンシノイド分子に化学的に連結させることによって調製される。例えば、米国特許第5,208,020号を参照されたい（その開示は、参照により本明細書に明示的に組み込まれている）。抗体1分子当たりにコンジュゲートされた平均3~4個のメイタンシノイド分子は、抗体の機能または溶解度に負の影響を及ぼさずに、標的細胞の細胞毒性を増強させるのに効力を示しているが、抗体1つ当たり毒素1分子でさえも、裸の抗体の使用を超えて細胞毒性を増強させると考えられる。メイタンシノイドは当技術分野で周知であり、既知の技術によって合成するか、または天然源から単離することができる。好適なメイタンシノイドは、例えば、米国特許第5,208,020号、ならびに本明細書において上で言及した他の特許及び非特許出版物に開示されている。いくつかの実施形態では、メイタンシノイドは、メイタンシノール、及び芳香環中またはメイタンシノール分子の他の位置で修飾されているメイタンシノール類似体、例えば、様々なメイタンシノールエステルである。  
40  
50

## 【0289】

抗体 - メイタンシノイドコンジュゲートを作製するための多くの連結基が当技術分野で知られており、これには、例えば、その開示が参照により本明細書に明示的に組み込まれる、米国特許第5,208,020号またはE P特許0 425 235 B1号、Charri et al., Cancer Research 52: 127-131 (1992)、及び2004年10月8日出願の米国特許出願第10/960,602号に開示されているものが含まれる。リンカー成分SMCCを含む抗体 - メイタンシノイドコンジュゲートは、2004年10月8日に出願された米国特許出願第10/960,602号に開示されているように調製することができる。連結基には、上で特定されている特許に開示されているような、ジスルフィド基、チオエーテル基、酸に不安定な基、光に不安定な基、ペプチダーゼに不安定な基、またはエステラーゼに不安定な基が含まれ、ジスルフィド及びチオエーテル基が、いくつかの実施形態で使用され得る。さらなる連結基が本明細書に記載及び例示されている。

10

## 【0290】

抗体及びメイタンシノイドのコンジュゲートは、N - スクシンイミジル - 3 - (2 - ピリジルジチオ)プロピオネート(S P D P)、スクシンイミジル - 4 - (N - マレイミドメチル)シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート(S M C C)、イミノチオラン(I T)、イミドエステルの二官能性誘導体(例えば、ジメチルアジピミデートH C 1)、活性エステル(例えば、スペリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド(例えば、グルタルアルデヒド)、ビス - アジド化合物(例えば、ビス(p - アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビス - ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス - (p - ジアゾニウムベンゾイル) - エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トルエン2,6 - デイソシアネート)、及びビス - 活性フッ素化合物(例えば、1,5 - ジフルオロ - 2,4 - ジニトロベンゼン)などの様々な二官能性タンパク質カップリング剤を使用して作製し得る。いくつかの実施形態では、カップリング剤には、ジスルフィド結合を提供するためのN - スクシンイミジル - 3 - (2 - ピリジルジチオ)プロピオネート(S P D P)(Carlsson et al., Biochem. J. 173: 723 - 737 (1978))及びN - スクシンイミジル - 4 - (2 - ピリジルチオ)ペンタノエート(S P P)が含まれる。

20

## 【0291】

リンカーは、連結の種類に応じて、様々な位置でメイタンシノイド分子に付着させ得る。例えば、エステル結合は、従来のカップリング技術を使用したヒドロキシル基との反応によって形成させてもよい。反応は、ヒドロキシル基を有するC - 3位置、ヒドロキシメチルで修飾されたC - 14位置、ヒドロキシル基で修飾されたC - 15位置、及びヒドロキシル基を有するC - 20位置で起こり得る。一実施形態では、連結は、メイタンシノールまたはメイタンシノール類似体のC - 3位置で形成される。

30

## 【0292】

## 2. アウリスタチン及びドラスタチン

いくつかの実施形態では、免疫コンジュゲートは、ドラスタチン、またはドロスタチン(dolostatin)ペプチド類似体及び誘導体のアウリスタチンにコンジュゲートされた抗体を含む(米国特許第5635483号、第5780588)。ドラスタチン及びアウリスタチンは、微小管動態、G T P加水分解、ならびに核分裂及び細胞分裂を妨害し(Woyke et al (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12): 3580 - 3584)、抗癌活性(US5663149)及び抗真菌活性(Pettit et al (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42: 2961 - 2965)を有することが示されている。ドラスタチンまたはアウリスタチン薬物部分は、ペプチド薬物部分のN(アミノ)末端またはC(カルボキシル)末端を介して抗体に付着させ得る(WO02/088172)。

40

## 【0293】

例示的なアウリスタチン実施形態には、その開示がその全体として参照により本明細書

50

に明示的に組み込まれる、2004年11月5日出願の米国特許出願第10/983,340号、“Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands”に開示されている、N末端で連結されたモノメチルアウリスタチン薬物部分DE及びDFが含まれる。

【0294】

典型的には、ペプチドに基づく薬物部分は、2つ以上のアミノ酸及び/またはペプチド断片の間にペプチド結合を形成させることによって調製することができる。そのようなペプチド結合は、例えば、ペプチド化学の分野で周知である液相合成法(E. Schrod er and K. Lubke, “The Peptides”, volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Pressを参照)に従って調製することができる。アウリスタチン/ドラスタチン薬物部分は、米国第5635483号、米国第5780588号、Pettit et al (1989) J. Am. Chem. Soc. 111: 5463-5465、Pettit et al (1998) Anti-Cancer Drug Design 13: 243-277、Pettit, G. R., et al. Synthesis, 1996, 719-725、及びPettit et al (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5: 859-863の方法に従って調製することができる。その全体が参考により本明細書に組み込まれる、Doronina (2003) Nat Biotechnol 21(7): 778-784、2004年11月5日出願の米国第10/983,340号、“Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands”(例えば、リンカー、及びリンカーにコンジュゲートされたMMAE及びMMAFなどのモノメチルバリン化合物を調製する方法を開示している)も参照されたい。

【0295】

3. カリケアマイシン

他の実施形態では、免疫コンジュゲートは、1つ以上のカリケアマイシン分子にコンジュゲートされた抗体を含む。カリケアマイシンファミリーの抗生物質は、ピコモル濃度未満の濃度で二本鎖DNAの切断を生じさせることができる。カリケアマイシンファミリーのコンジュゲートの調製については、米国特許第5,712,374号、第5,714,586号、第5,739,116号、第5,767,285号、第5,770,701号、第5,770,710号、第5,773,001号、第5,877,296号(全て、American Cyanamid Companyのもの)を参照されたい。使用し得るカリケアマイシンの構造類似体には、限定されないが、1I、2I、3I、N-アセチル-1I、PSAG、及びI1が含まれる(Hinman et al., Cancer Research 53: 3336-3342 (1993)、Lode et al., Cancer Research 58: 2925-2928 (1998)、及びAmerican Cyanamidの前述の米国特許)。抗体をコンジュゲートさせることができる別の抗腫瘍薬は、抗葉酸剤であるQFAである。カリケアマイシン及びQFAはどちらも細胞内作用部位を有しており、形質膜を容易には横断しない。したがって、抗体媒介性の内在化を介したこれらの薬剤の細胞取り込みは、その細胞毒性効果を大いに増強する。

【0296】

4. 他の細胞毒性剤

抗体にコンジュゲートさせることができる他の抗腫瘍剤には、BCNU、ストレプトゾイシン、ビンクリスチシン、及び5-フルオロウラシル、LL-E33288複合体と総称される、米国特許第5,053,394号、第5,770,710号に記載の薬剤ファミリー、ならびにエスペラマイシン(米国特許第5,877,296号)が含まれる。

【0297】

使用可能な酵素活性毒素及びその断片には、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合性活性断片、外毒素A鎖(緑膿菌由来)、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシンA鎖、ア

10

20

30

30

40

50

ルファ - サルシン、シナアブラギリタンパク質、ジアンチンタンパク質、フィトラカ・アメリカーナ (Phytolaca americana) タンパク質 (PAP I、PAP II、及びPAP-S)、ニガウリ阻害剤、クルシン、クロチン、サパオナリア・オフィシナリス (sapoanaria officinalis) 阻害剤、ゲロニン、ミトグリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、及びトリコテセンが含まれる。例えば、1993年10月28日公開のWO93/21232を参照されたい。

## 【0298】

本発明は、抗体と、核酸分解活性（例えば、リボヌクレアーゼまたはDNAエンドヌクレアーゼ、例えば、デオキシリボヌクレアーゼ；DNAアーゼ）を有する化合物との間で形成された免疫コンジュゲートをさらに企図している。

10

## 【0299】

腫瘍の選択的破壊のために、抗体は、高放射性原子を含み得る。様々な放射性同位体が、放射性コンジュゲートされた抗体の生成に利用可能である。例としては、 $^{211}\text{At}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{212}\text{Bi}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{212}\text{Pb}$ 、及び $^{113}\text{Lu}$ の放射性同位体が挙げられる。コンジュゲートを検出に使用する場合、それは、シンチグラフィー研究用の放射性原子、例えば、 $^{99m}\text{Tc}$ もしくは $^{123}\text{I}$ 、または核磁気共鳴 (NMR) イメージング（磁気共鳴イメージング、MRIとしても知られる）用のスピン標識、例えば、再度のヨウ素-123、ヨウ素-131、インジウム-111、フッ素-19、炭素-13、窒素-15、酸素-17、ガドリニウム、マンガン、もしくは鉄を含み得る。

20

## 【0300】

放射性標識または他の標識は、既知の方法でコンジュゲート中に組み込み得る。例えば、ペプチドは、例えば、水素の代わりにフッ素-19を含む好適なアミノ酸前駆体を使用して、生合成させてもよく、または化学的アミノ酸合成によって合成してもよい。Labels such as  $^{99m}\text{Tc}$  または  $^{123}\text{I}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、及び $^{111}\text{In}$ などの標識は、ペプチド中のシステイン残基を介して付着させることができる。イットリウム-90は、リジン残基を介して付着させることができる。IODOGEN法 (Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57) を使用して、ヨウ素-123を組み込むことができる。“Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy” (Chatal, CRC Press 1989) は他の方法を詳細に記載している。

30

## 【0301】

抗体及び細胞毒性剤のコンジュゲートは、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート (SPDP)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート (SMCC)、イミノチオラン (IT)、イミドエステルの二官能性誘導体（例えば、ジメチルアジピミデートHCl）、活性エステル（例えば、スペリン酸ジスクシンイミジル）、アルデヒド（例えば、グルタルアルデヒド）、ビス-アジド化合物（例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン）、ビス-ジアゾニウム誘導体（例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン）、ジイソシアネート（例えば、トルエン2,6-ジイソシアネート）、及びビス-活性フッ素化合物（例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン）などの様々な二官能性タンパク質カップリング剤を使用して作製し得る。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta et al., Science, 238: 1098 (1987) に記載されているように調製することができる。炭素-14標識した1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸 (MX-DTPA) は、放射性ヌクレオチドを抗体にコンジュゲートさせるための例示的なキレート化剤である。WO94/11026を参照されたい。リンカーは、細胞内での細胞毒性薬の放出を容易にする「切断可能なリンカー」であり得る。例えば、酸に不安定なリンカー、ペプチダーゼ感受性リンカー、光に不安定なリンカー、ジメチルリンカー、またはジスルフィド含有リンカー

40

50

(Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992)、米国特許第5,208,020号)を使用してもよい。

【0302】

化合物は、限定されないが、クロスリンカー試薬：(例えば、Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.Aから)市販されている、BMPs、EMCs、GMBs、HBVs、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、スルホ-EMCs、スルホ-GMBs、スルホ-KMUs、スルホ-MBs、スルホ-SIAB、スルホ-SMCC、及びスルホ-SMPB、ならびにS V S B (スクシンイミジル-(4-ビニルスルホン)ベンゾエート)を用いて調製されたADCを明示的に企図している。2003-2004 Applications Handbook and Catalogの467~498ページを参照されたい。

【0303】

5. 抗体薬物コンジュゲートの調製

抗体薬物コンジュゲート(ADC)中で、抗体(Ab)は、リンカー(L)を介して、1つ以上の薬物部分(D)、例えば、抗体1つ当たり約1~約20個の薬物部分( $p = 1$ ~約20)にコンジュゲートされている。下に示す式のADCは、(1)共有結合を介して、Ab-Lを形成させるための、抗体の求核基と二価リンカー試薬との反応と、それに続く、薬物部分Dとの反応、及び(2)共有結合を介して、D-Lを形成させるための、薬物部分の求核基と二価リンカー試薬との反応と、それに続く、抗体の求核基との反応を含む、当業者に既知の有機化学の反応、条件、及び試薬を用いて、いくつかの経路によって調製し得る。ADCを調製するためのさらなる方法が本明細書に記載されている。

Ab - (L - D)<sub>p</sub>

【0304】

リンカーは、1つ以上のリンカー成分から構成され得る。例示的なリンカー成分には、6-マレイミドカプロイル(「MC」)、マレイミドプロパノイル(「MP」)、バリン-シトルリン(「val-cit」)、アラニン-フェニルアラニン(「ala-phe」)、p-アミノベンジルオキシカルボニル(「PAB」)、N-スクシンイミジル4-(2-ピリジルチオ)ペンタノエート(「SPP」)、N-スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1カルボキシレート(「SMCC」)、及びN-スクシンイミジル(4-ヨード-アセチル)アミノベンゾエート(「SIAB」)が含まれる。さらなるリンカー成分が当技術分野で既知であり、その一部が本明細書に記載されている。その全体が参照により本明細書に組み込まれる、2004年11月5日出願の米国第10/983,340号、“Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands”を参照されたい。

【0305】

いくつかの実施形態では、リンカーは、アミノ酸残基を含み得る。例示的なアミノ酸リンカー成分には、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド、またはペントペプチドが含まれる。例示的なジペプチドには：バリン-シトルリン(vcまたはval-cit)、アラニン-フェニルアラニン(afまたはala-phe)が含まれる。例示的なトリペプチドには：グリシン-バリン-シトルリン(gly-val-cit)及びグリシン-グリシン-グリシン(gly-gly-gly)が含まれる。アミノ酸リンカー成分を含むアミノ酸残基には、天然に存在するもの、ならびに少数アミノ酸及び天然に存在しないアミノ酸類似体、例えば、シトルリンが含まれる。アミノ酸リンカー成分を設計し、特定の酵素、例えば、腫瘍関連プロテアーゼ、カテプシンB、C、及びD、またはプラスミンプロテアーゼによる酵素切断に対するその選択性について最適化することができる。

【0306】

抗体上の求核基には、限定されないが：(i)N末端アミン基、(ii)側鎖アミン基、例えば、リジン、(iii)側鎖チオール基、例えば、システイン、及び(iv)抗体

10

20

30

40

50

がグリコシル化されている場合、糖のヒドロキシルまたはアミノ基が含まれる。アミン、チオール、及びヒドロキシル基は求核性であり、(i) N H S エステル、H O B t エステル、ハロホルメート、及び酸ハロゲン化物などの活性エステル；(ii) ハロアセトアミドなどのアルキル及びベンジルハロゲン化物；(iii) アルデヒド、ケトン、カルボキシル、及びマレイミド基を含む、リンカー部分及びリンカー試薬上の求電子基と反応して共有結合を形成することができる。特定の抗体は、還元可能な鎖間ジスルフィド、すなわち、システイン架橋を有する。抗体は、D T T (ジチオスレイトール)などの還元剤での処理によるリンカー試薬とのコンジュゲーションに対して反応性にし得る。したがって、各々のシステイン架橋は、理論的には、2つの反応性チオール求核剤を形成する。アミンからチオールへの変換を生じさせるリジンと2-イミノチオラン(トラウト試薬)との反応によって、さらなる求核基を抗体に導入することができる。1つ、2つ、3つ、4つ、またはそれ以上のシステイン残基を導入する(例えば、1つ以上の非天然システインアミノ酸残基を含む突然変異体抗体を調製する)ことによって、反応性チオール基を抗体(またはその断片)に導入し得る。

10

### 【0307】

抗体薬物コンジュゲートはまた、リンカー試薬または薬物上の求核置換基と反応することができる求電子部分を導入するための抗体の修飾によって生成させてもよい。グリコシル化された抗体の糖を、例えば、過ヨウ素酸酸化剤を用いて酸化させ、リンカー試薬または薬物部分のアミン基と反応し得るアルデヒドまたはケトン基を形成させることができる。得られるイミンシップ塩基基は、安定な連結を形成してもよく、または例えば、水素化ホウ素試薬によって還元されて安定なアミン連結を形成してもよい。一実施形態では、グリコシル化された抗体の炭水化物部分と、グラクトース(g l a c t o s e)オキシダーゼまたはメタ過ヨウ素酸ナトリウムのいずれかとの反応は、薬物上の適切な基と反応することができるタンパク質中のカルボニル(アルデヒド及びケトン)基を生じさせることができる(H e r m a n s o n, B i o c o n j u g a t e T e c h n i q u e s)。別の実施形態では、N末端セリンまたはトレオニン残基を含むタンパク質は、メタ過ヨウ素酸ナトリウムと反応して、第1のアミノ酸の代わりにアルデヒドの生成をもたらすことができる(G e o g h e g a n & S t r o h, (1992) B i o c o n j u g a t e C h e m. 3: 138-146、米国第5362852号)。そのようなアルデヒドは、薬物部分またはリンカー求核剤と反応させることができる。

20

### 【0308】

同様に、薬物部分上の求核基には、限定されないが：(i) N H S エステル、H O B t エステル、ハロホルメート、及び酸ハロゲン化物などの活性エステル；(ii) ハロアセトアミドなどのアルキル及びベンジルハロゲン化物；(iii) アルデヒド、ケトン、カルボキシル、及びマレイミド基：を含むリンカー部分及びリンカー試薬上の求電子基と反応して共有結合を形成することができる、アミン、チオール、ヒドロキシル、ヒドラジド、オキシム、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレート、及びアリールヒドラジド基が含まれる。

30

### 【0309】

あるいは、抗体及び細胞毒性剤を含む融合タンパク質は、例えば、組換え技術またはペプチド合成によって作製し得る。D N Aの長さは、互いに隣接するか、またはコンジュゲートの所望の特性を破壊しないリンカーペプチドをコードする領域によって隔離されているかのいずれかの、コンジュゲートの2つの部分をコードする各々の領域を含み得る。

40

### 【0310】

さらに別の実施形態では、抗体を、腫瘍のプレターゲッティングで利用する「受容体」(例えば、ストレプトアビシン)にコンジュゲートさせることができ、この場合、抗体-受容体コンジュゲートを患者に投与し、次いで、クリアリング剤を用いて未結合のコンジュゲートを循環から除去し、その後、細胞毒性剤(例えば、放射性ヌクレオチド)にコンジュゲートされている「リガンド」(例えば、アビシン)を投与する。様々な放射性核種が、放射性コンジュゲートされた抗体の產生のために利用可能である。例としては、<sup>21</sup>

50

<sup>2</sup> B i 、 <sup>1</sup> <sup>3</sup> <sup>1</sup> I 、 <sup>1</sup> <sup>3</sup> <sup>1</sup> I n 、 <sup>9</sup> <sup>0</sup> Y 、 及び <sup>1</sup> <sup>8</sup> <sup>6</sup> R e が挙げられる。

【 0 3 1 1 】

V . 方法

A . 抗体を用いた突然変異体 S M O の診断方法及び検出方法

一態様では、本開示の抗体は、生体試料中の突然変異体 S M O の存在を検出するために有用である。本明細書で使用される「検出すること」という用語は、定量的または定性的な検出を包含する。ある特定の実施形態では、生体試料は、細胞または組織、例えば、腫瘍組織を含む。

【 0 3 1 2 】

一態様では、本開示は、生体試料中の突然変異体 S M O の存在を検出する方法を提供する。特定の実施形態では、本方法は、抗突然変異体 S M O 抗体と突然変異体 S M O との結合が許容される条件下で、生体試料を抗突然変異体 S M O 抗体と接触させること、及び抗突然変異体 S M O 抗体と突然変異体 S M O の間で複合体が形成されるかどうかを検出することを含む。

【 0 3 1 3 】

一態様では、本開示は、突然変異体 S M O の発現と関連付けられる障害または条件、例えば、突然変異体 S M O の発現と関連付けられる薬物耐性を診断する方法を提供する。ある特定の実施形態では、本方法は、試験細胞を抗突然変異体 S M O 抗体と接触させること；抗突然変異体 S M O 抗体と突然変異体 S M O との結合を検出することによって、試験細胞による突然変異体 S M O の発現のレベルを（定量的または定性的に）決定すること；及び試験細胞による突然変異体 S M O の発現のレベルを対照細胞（例えば、試験細胞と同じ組織起源の正常細胞またはそのような正常細胞と同程度のレベルで野生型 S M O を発現する細胞）による突然変異体 S M O の発現のレベルと比較することを含み、該対照細胞と比較して試験細胞による突然変異体 S M O の発現のレベルがより高い場合は、突然変異体 S M O の発現の増大と関連する障害の存在を示す。ある特定の実施形態では、試験細胞は、突然変異体 S M O の発現の増大と関連する障害を有することが疑われる個体から得られる。ある特定の実施形態では、障害は、癌または腫瘍などの細胞増殖性障害である。例えば腫瘍試料中で、 S M O 発現における不均一性があり得ることが理解される。こうして、試料において、試料中の細胞のサブセットのみが突然変異体 S M O を発現し得、そのような発現が、例えば、薬物耐性と関連付けるのに十分であることが理解される。したがって、発現を検査することは、試料中の発現を検査すること、及び試料中の細胞のサブセットにおける突然変異体 S M O タンパク質を検出することを伴う。

【 0 3 1 4 】

本開示の抗体を使用して診断し得るかまたは薬物耐性を検査することができる例示的な疾患には、限定されないが、髄芽細胞腫、膵臓癌基底細胞癌が含まれる。

【 0 3 1 5 】

ある特定の他の方法を使用して、抗体と突然変異体 S M O との結合を検出することができる。そのような方法には、限定されないが、ウェスタンプロット、放射免疫アッセイ、 E L I S A ( 酵素連結免疫吸着アッセイ ) 、「サンドイッチ」免疫アッセイ、免疫沈降アッセイ、蛍光免疫アッセイ、プロテイン A 免疫アッセイ、及び免疫組織化学 ( I H C ) などの、当技術分野で周知の抗原結合アッセイが含まれる。

【 0 3 1 6 】

ある特定の実施形態では、抗体を標識する。標識には、限定されないが、直接的に検出される標識または部分（例えば、蛍光標識、発色団標識、高電子密度標識、化学発光標識、及び放射性標識）、ならびに間接的に、例えば、酵素反応または分子相互作用を介して検出される、酵素またはリガンドなどの部分が含まれる。例示的な標識には、限定されないが、放射性同位体 <sup>3</sup> <sup>2</sup> P 、 <sup>1</sup> <sup>4</sup> C 、 <sup>1</sup> <sup>2</sup> <sup>5</sup> I 、 <sup>3</sup> H 、及び <sup>1</sup> <sup>3</sup> <sup>1</sup> I 、希土類キレートまたはフルオレセイン及びその誘導体などのフルオロフォア、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ルシフェラーゼ ( l u c e r i f e r a s e ) 、例えば、ホタルルシフェラーゼ及び細菌ルシフェラーゼ（米国特許第 4,737,456 号）、ル

10

20

30

40

50

シフェリン、2,3-ジヒドロフラジンジオン、西洋ワサビペルオキシダーゼ（H R P）、アルカリホスファターゼ、-ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、サッカリドオキシダーゼ、例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、及びグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、過酸化水素を用いて色素前駆体を酸化する酵素、例えば、H R P、ラクトペルオキシダーゼ、またはミクロペルオキシダーゼと共に、ウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼなどの複素環オキシダーゼ、ビオチン/アビジン、スピノン標識、バクテリオファージ標識、安定なフリーラジカルなどが含まれる。

### 【0317】

ある特定の実施形態では、抗体を不溶性マトリックス上に固定する。固定は、抗突然変異体S M O抗体を、溶液中に遊離したまま残る全ての突然変異体S M Oから分離することを必要とする場合がある。これは、従来、水不溶性のマトリックスもしくは表面への吸着のような、アッセイ手順の前に抗突然変異体S M O抗体を不溶化することによるか（Bennichら、米国第3,720,760号）、または共有結合によるか（例えば、グルタルアルデヒド架橋を使用する）、または抗突然変異体S M O抗体と突然変異体S M Oとの間での複合体の形成後に、例えば、免疫沈降によって抗突然変異体S M O抗体を不溶化することによるかのいずれかで達成される。

### 【0318】

診断または検出の上記実施形態はいずれも、抗突然変異体S M O抗体の代わりにまたはそれに加えて、本開示の免疫コンジュゲートを使用して実施し得ることが理解される。

### 【0319】

#### B. 核酸プローブを用いて突然変異体S M Oを検出する方法

一態様では、本明細書に記載の核酸プローブは、生体試料中の突然変異体S M O核酸の存在を検出するために有用である。本明細書で使用される「検出すること」という用語は、定量的または定性的な検出を包含する。ある特定の実施形態では、生体試料は、細胞または組織、例えば、腫瘍組織を含む。

### 【0320】

一態様では、本開示は、生体試料中の突然変異体S M Oをコードする核酸の存在を検出する方法を提供する。ある特定の実施形態では、本方法は、生体試料由来の核酸を本明細書に記載のプローブと接触させること、ストリンジメントな条件下でのハイブリダイゼーションが許容される条件下でプローブを核酸にハイブリダイズさせること、及びプローブと核酸試料との間に複合体が形成されるかどうかを検出することを含む。

### 【0321】

突然変異体S M Oをコードする核酸は、限定されないが、本明細書に記載のプローブの使用、もしくはP C R增幅、r t P C Rシーケンシング、一本鎖立体構造多型（S S C P）、D N Aの示差制限消化（D N Aの制限酵素消化による差異）、ハイブリダイゼーションによるものを含む、当技術分野で既知の任意の方法、または当技術分野で既知の任意の他の方法を使用して検出し得る。

### 【0322】

これらの方法では、細胞における本明細書に記載の突然変異体S M Oの検出は、突然変異体S M Oの発現の増大と関連する障害（すなわち、G D C - 0 4 4 9などのS M O阻害剤による治療に対する耐性）の存在を示す。ある特定の実施形態では、試験細胞は、突然変異体S M Oの発現と関連する耐性腫瘍を有することが疑われる個体から得られる。上で詳述したように、突然変異は、腫瘍試料由来の細胞のサブセットなどの試料由来の細胞のサブセットにおけるものであってもよいことが理解される。

### 【0323】

本開示の抗体を使用して診断し得る例示的な障害には、限定されないが、髄芽細胞腫、脾臓癌基底細胞癌が含まれる。

### 【0324】

#### C. 細胞に基づくアッセイで突然変異体S M Oを検出する方法

10

20

30

40

50

突然変異体 SMO は、限定されないが、腫瘍試料または突然変異体 SMO を含むことが疑われる組織の組織学的調製物の腫瘍試料インビトロ免疫組織化学的染色などの、突然変異体 SMO 検出抗体と細胞試料の表面との結合を含む、当技術分野で既知の細胞に基づくアッセイにおいて検出し得る。Hh シグナル伝達が起こるかどうかを（例えば、経路成分の活性化、G1i の発現などを測定することによって）決定するために、組織試料を GDC-0449 及びヘッジホッグと接触させる機能的アッセイがある。GDC-0449 を使用して分断することができる、Hh シグナル伝達経路を使用する任意の機能的アッセイを本開示の方法で使用して、突然変異体 SMO の存在及び活性を決定し得る。

### 【0325】

D. 突然変異体 SMO に結合する化合物についてスクリーニングする方法

いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書に開示の突然変異体 SMO タンパク質のいずれかを発現する細胞においてヘッジホッグシグナル伝達を阻害することができるヘッジホッグ経路阻害剤についてスクリーニングする方法を提供する。いくつかの実施形態では、スクリーニングは、単一の薬剤または個別の数の薬剤のスクリーニングである。いくつかの実施形態では、スクリーニングは、薬剤のプールのスクリーニングである。いくつかの実施形態では、スクリーニングは、ハイスループットスクリーニングである。いくつかの実施形態では、スクリーニングは、化合物のライブラリー（単数または複数）（例えば、小分子のライブラリー、アンチセンスオリゴヌクレオチドのライブラリー、抗体またはペプチドのライブラリー）のスクリーニングである。いくつかの実施形態では、スクリーニングは、一次アッセイのみか、または一次アッセイ及び 1 つ以上の二次アッセイを併い得る。いくつかの実施形態では、薬剤は、アッセイ（例えば、ヘッジホッグシグナル伝達アッセイ（例えば、本明細書に記載または当技術分野で既知の G1i 1 発現アッセイのいずれかを使用して、薬剤に応答した G1i 1 核酸またはタンパク質発現を検査することによる）、突然変異体 SMO タンパク質結合アッセイ（例えば、本明細書に記載の突然変異体 SMO 結合アッセイのいずれかを使用することによる）、細胞増殖アッセイ（例えば、本明細書に記載または当技術分野で既知の細胞増殖アッセイのいずれかを使用することにより）において評価することができる。スクリーニングアッセイにおける使用は、本開示の突然変異体 SMO タンパク質及び核酸への例示的な使用である（例えば、突然変異体 SMO タンパク質は、無細胞アッセイまたは細胞に基づくアッセイにおいて使用することができ、突然変異体 SMO 核酸をベクター中で提供し、スクリーニングアッセイに好適な宿主細胞または宿主生物において突然変異体 SMO タンパク質を発現させるために使用することができる。

### 【0326】

本開示は、突然変異体 SMO に結合する化合物についてスクリーニングする方法を提供する。任意の特定の作動様式に拘泥するものではないが、GDC-0449 が野生型 SMO に結合して、突然変異体 SMO には結合しないのと同じように、突然変異体 SMO の阻害剤として作用する化合物であれば、突然変異体 SMO に結合するであろうと考えられる。したがって、突然変異体 SMO タンパク質またはその断片、例えば、膜貫通ドメイン（TM6）の全てまたは一部を含む断片を発現させ、化合物のライブラリーを使用する結合アッセイを当技術分野で既知の任意の手段によって実行し得る。また、GDC-0449 の可能性のある接触点に基づくモデリング手法を使用して、GDC-0449 のバリエーションによって表されるより小さい化合物ライブラリーを使用し、その後、突然変異体 SMO と GDC-0449 のバリエーションとの類似の接触点をモデリングしてもよい。そのようなモデリングプログラム及びアルゴリズムは、当技術分野で既知である任意のものであり得る。野生型と突然変異体 SMO の両方の阻害剤となる、突然変異体 SMO 及び野生型 SMO に結合する化合物を同定し得る。あるいは、突然変異体 SMO には結合するが、野生型 SMO には結合せず、それゆえ、突然変異体 SMO のみに対する阻害剤となる化合物を発見してもよい。ある特定の実施形態では、結合及び / または何らかの他の読み出し（例えば、ヘッジホッグシグナル伝達）を評価し、野生型 SMO または好適な対照（例えば、空ベクター）についてのものと比較する。

10

20

30

40

50

## 【0327】

一実施形態では、スクリーニングされるべき化合物は、GDC-0449の変異体などの小分子化合物である。他の実施形態では、突然変異体SMOに結合する化合物は、GDC-0449と野生型SMOとの結合部位と同じ領域中にあるエピトープを特異的に認識する抗体である。一実施形態では、抗体は、突然変異体SMOのTM6のカルボキシ末端部分の領域に結合し、突然変異体SMO活性を阻害する。

## 【0328】

あるいは、またはさらに、化合物を、突然変異体SMO活性を阻害するその能力についてスクリーニングしてもよい。これらの実施形態では、突然変異体SMOを発現する細胞のヘッジホッグシグナル伝達を阻害するこれらの化合物の能力を評価し得る。これらのアッセイは、インタクトのヘッジホッグシグナル伝達経路を有するが、野生型SMOの代わりにまたはそれに加えて突然変異を有する組換えSMOを発現する細胞で実施し得る。これらのアッセイでは、候補阻害剤の存在または非存在下でヘッジホッグとともにインキュベートした場合に、活性のあるヘッジホッグシグナル伝達を有する細胞の能力を決定する。ヘッジホッグシグナル伝達が候補化合物の存在下で阻害される場合、そのような化合物は、ヘッジホッグ阻害剤である。いくつかの実施形態では、細胞は、野生型及び突然変異体SMOの両方を発現しており、GDC-0449及び候補阻害剤とともにインキュベートする。他の実施形態では、細胞は、突然変異SMOのみを発現しており、Hh及び候補阻害剤のみとともに（すなわち、GDC-0449の非存在下で）インキュベートしてもよい。Hhシグナル伝達がそのような細胞で低下するかまたは阻害される場合、化合物は、突然変異体SMOの阻害剤である。

10

20

30

40

## 【0329】

いくつかの実施形態では、本開示は、ヘッジホッグ経路阻害剤を同定する方法であって、細胞をある量の試験薬剤と接触させることであって、該細胞が、ヘッジホッグタンパク質に応答するか、または増加したヘッジホッグシグナル伝達及び/もしくはヘッジホッグシグナル伝達経路の活性化を有し、該細胞が、本明細書に記載の突然変異体SMOタンパク質のいずれかを発現する、接触させることと、b)試験薬剤が細胞においてヘッジホッグシグナル伝達を阻害するかどうかを対照と比較して決定することであって、試験薬剤が対照と比べて細胞においてヘッジホッグシグナル伝達を阻害する場合には、試験薬剤がヘッジホッグ経路阻害剤として同定される、決定することと、を含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、対照（または比較の基準）は、野生型SMOタンパク質（例えば、配列番号1のアミノ酸配列を有するSMOタンパク質）を発現している細胞である。いくつかの実施形態では、対照は、試験薬剤と接触させた細胞と同じ突然変異体SMOタンパク質を発現している細胞であり、対照は、処理されないか、または突然変異体SMOタンパク質が部分的または完全に耐性である対照薬剤で処理される。いくつかの実施形態では、対照薬剤は、ビスマデギブ、LY2940680、LDE225、及び/または化合物5である。いくつかの実施形態では、試験薬剤は、突然変異体SMOタンパク質と結合するが、野生型SMOタンパク質とは結合しない。いくつかの実施形態では、試験薬剤は、突然変異体SMOタンパク質及び野生型SMOタンパク質の両方と結合する。いくつかの実施形態では、試験薬剤は、突然変異体SMOタンパク質を発現している細胞におけるヘッジホッグシグナル伝達の阻害において野生型SMOタンパク質を発現している細胞よりも有効である。

## 【0330】

いくつかの実施形態では、本開示は、ヘッジホッグ経路阻害剤を同定する方法であって、細胞をある量の薬剤と接触させることであって、該細胞が、ヘッジホッグタンパク質に応答するか、または増加したヘッジホッグシグナル伝達及び/もしくはヘッジホッグシグナル伝達経路の活性化を有し、該細胞が、本明細書に記載の突然変異体SMOタンパク質のいずれかを発現する、接触させることと、b)薬剤が細胞の成長及び/または増殖を阻害するかどうかを対照と比較して決定することであって、薬剤が対照と比べて細胞の成長及び/または増殖を阻害する場合には、薬剤がヘッジホッグ経路阻害剤として同定される

50

、決定することと、を含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、対照は、野生型 SMOタンパク質（例えば、配列番号 1 のアミノ酸配列を有する SMOタンパク質）を発現している細胞である。いくつかの実施形態では、対照は、試験薬剤と接触させた細胞と同じ突然変異体 SMOタンパク質を発現している細胞であり、対照は、処理されないか、または突然変異体 SMOタンパク質が部分的または完全に耐性である対照薬剤で処理される。いくつかの実施形態では、対照薬剤は、ビスモデギブ、LY2940680、LDE225、及び／または化合物 5 である。いくつかの実施形態では、試験薬剤は、突然変異体 SMOタンパク質と結合するが、野生型 SMOタンパク質とは結合しない。いくつかの実施形態では、試験薬剤は、突然変異体 SMOタンパク質及び野生型 SMOタンパク質の両方と結合する。いくつかの実施形態では、試験薬剤は、突然変異体 SMOタンパク質を発現している細胞の成長及び／または増殖の阻害において野生型 SMOタンパク質を発現している細胞よりも有効である。

10

### 【0331】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のスクリーニング方法で使用される細胞は、培養下にある。いくつかの実施形態では、培養細胞と接触させる薬剤は、細胞培養中の細胞の少なくとも 10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または 100% においてヘッジホッグシグナル伝達を部分的または完全に阻害するのに十分なものである。いくつかの実施形態では、培養細胞と接触させる薬剤は、細胞培養中の細胞の少なくとも 10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または 100% の細胞の増殖率及び／または生存率を低下させるのに十分なものであり、該細胞は、ヘッジホッグを発現または過剰発現しているか、あるいは活性なヘッジホッグシグナル伝達を有する。

20

### 【0332】

他の実施形態では、細胞は動物中にある。いくつかの実施形態では、動物は哺乳動物または他の脊椎動物である。いくつかの実施形態では、動物は出生後である。いくつかの実施形態では、動物は小児である。いくつかの実施形態では、動物は成体である。インビトロの細胞に言及するとき、これらの細胞は、任意の脊椎動物種、例えば、齧歯動物、ハムスター、またはヒトなどの哺乳動物のもので得る。インビトロであってもインビボであっても、細胞は、原発性癌細胞、転移性癌細胞、または癌細胞株などの癌細胞で得る。いくつかの実施形態では、細胞は髄芽細胞腫細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は基底細胞癌細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は母斑性基底細胞癌細胞である。いくつかの実施形態では、細胞はゴーリン症候群細胞である。

30

### 【0333】

いくつかの実施形態では、細胞は、ヘッジホッグシグナル伝達経路遺伝子において 1 つ以上の突然変異を含む。いくつかの実施形態では、その 1 つ以上の突然変異は p a t c h e d におけるものである。いくつかの実施形態では、p a t c h e d 突然変異は機能喪失型突然変異である。いくつかの実施形態では、その 1 つ以上の突然変異はスムースンドにおけるものである。いくつかの実施形態では、スムースンド突然変異は、スムースンド機能獲得型突然変異である。いくつかの実施形態では、機能獲得型スムースンド突然変異は、構成的に活性なスムースンドタンパク質をもたらす。いくつかの実施形態では、その 1 つ以上の突然変異は、サプレッサー・オブ・フューズドにおけるものであり、細胞は、サプレッサー・オブ・フューズド (S u F u または S U F U ) 機能喪失を有する。いくつかの実施形態では、S u F u 突然変異は、S u F u 活性の部分的な機能喪失をもたらす。いくつかの実施形態では、S u F u 突然変異は、S u F u 活性の完全な機能喪失をもたらす。いくつかの実施形態では、S u F u 突然変異は、ビスモデギブに対する耐性を付与する。

40

### 【0334】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のスクリーニング方法のいずれかで試験される薬剤は、小分子である。他の実施形態では、本薬剤はポリペプチドである。他の実施形態では、本薬剤は s i R N A アンタゴニストである。

50

## 【0335】

本明細書に記載のスクリーニング方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、突然変異体SMO-DNAは、細胞において外因的に発現される。いくつかの実施形態では、突然変異体SMO-DNAは、細胞において安定して発現される。いくつかの実施形態では、突然変異体SMO-DNAは、細胞において一時的に発現される。

## 【0336】

本開示で使用可能な様々なヘッジホッグ経路阻害剤の成長阻害効果は、当技術分野で既知の方法によって、例えば、内因的に、またはそれぞれの突然変異体SMO遺伝子によるトランスフェクションの後で突然変異体SMOポリペプチドを発現する細胞を使用して、評価し得る。例えば、好適な腫瘍細胞株、及び突然変異体SMOをコードするDNAでトランスクレクトした細胞を、本開示のヘッジホッグ経路阻害剤を様々な濃度で用いて数日間（例えば、2～7日間）処理し、クリスタルバイオレット、MTTで染色するか、または何らかの他の比色またはルシフェラーゼ系（例えば、CellTiterGlo）アッセイによって分析してもよい。増殖を測定する別 の方法は、<sup>3</sup>H-チミジン取り込みを、そのようなヘッジホッグ経路阻害剤の存在下または非存在下で処理した細胞によって比較することによる。処理後、細胞を採取し、DNAに組み込まれた放射能の量をシンチレーションカウンターにおいて定量化する。適切な陽性対照は、選択された細胞株の処理を含み、細胞株は、その細胞株の成長を阻害することが知られている成長阻害抗体または小分子を有する。インビボでの腫瘍細胞の成長阻害は、当技術分野で既知の様々な方法で決定することができる。いくつかの実施形態では、腫瘍細胞は、ヘッジホッグ経路シグナル伝達遺伝子において1つ以上の突然変異を有するものである。いくつかの実施形態では、そのようなヘッジホッグ経路阻害剤は、未処理の腫瘍細胞と比較して約10～25%、約25～100%、約30～100%、約50～100%、または約または70～100%、インビトロまたはインビボでヘッジホッグ発現腫瘍細胞の細胞増殖を阻害することになる。成長阻害は、細胞培養中、約0.5～30μg/ml、約0.5nM～200nM、約200nM～1μM、約1μM～5μM、または5μM～10μMのヘッジホッグ経路阻害剤濃度で測定し得、ここでは、成長阻害を腫瘍細胞のアンタゴニストへの曝露後1～10日に決定する。アンタゴニストは、体重1kg当たり約1μg/kg～約100mg/kgでのアンタゴニスト及び/またはアゴニストの投与が、本抗体または小分子アンタゴニストの最初の投与から約5日～3カ月以内、いくつかの実施形態では、約5～30日以内に腫瘍サイズの低下または腫瘍細胞増殖の低下をもたらす場合に、インビボで成長阻害性である。

## 【0337】

いくつかの実施形態では、細胞死滅を誘導するヘッジホッグ経路阻害剤を選択するため、例えば、ヨウ化プロピジウム（PI）、トリパンブルー、または7AAD取り込みによって示される膜統合性の喪失を対照と比較して評価し得る。PI取り込みアッセイは、補体及び免疫エフェクター細胞の非存在下で実行することができる。いくつかの実施形態では、突然変異体SMOタンパク質を発現する発現腫瘍細胞を、培地のみ、または適切なヘッジホッグ経路阻害剤を含有する培地とともにインキュベートする。細胞を3日間インキュベートする。各処理の後、細胞を洗浄し、細胞塊の除去のために、35mmの濾過器で蓋をした12×75試験管（試験管当たり1ml、処理群当たり試験管3本）に等分する。次に試験管にPI（10μg/ml）を投入する。試料は、FACSCAN（登録商標）フローサイトメトリー及びFACSCONVERT（登録商標）CellQuestソフトウェア（Becton Dickinson）、または当業者が分析に使用する任意の他の装置を使用して分析し得る。その後、PI取り込みによって決定して統計的に有意なレベルの細胞死滅を誘導するこれらのヘッジホッグ経路阻害剤を選択し得る。

## 【0338】

いくつかの実施形態では、突然変異体SMOポリペプチド上でエピトープに結合するヘッジホッグ経路阻害剤についてスクリーニングするために、Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab

10

20

30

40

50

oratory, Ed Harlow and David Lane (1988) に記載されているものなどの慣習的な交差遮断アッセイを実行することができる。このアッセイを使用して、試験抗体、ポリペプチド、オリゴペプチド、または他の有機分子が、既知のヘッジホッグ経路阻害剤と同じ部位またはエピトープに結合するかどうかを決定することができる。あるいは、またはさらに、エピトープマッピングを当技術分野で既知の方法によって実行し得る。例えば、突然変異体SMOタンパク質配列に、アラニンスキャニング、または免疫学的に明白に異なるGPCRタンパク質を有するキメラを作製することによって突然変異を起こさせ、接触残基を同定することができる。突然変異体抗原をまずポリクローナル抗体との結合について試験して、適当な折り畳みを保障する。異なる方法においては、突然変異体SMOタンパク質の異なる領域に対応するペプチドを、試験抗体、または試験抗体と特性評価済みもしくは既知のエピトープとを有する抗体との競合アッセイで使用することができる。

10

## 【0339】

いくつかの実施形態では、突然変異体SMOタンパク質または候補ヘッジホッグ経路阻害薬剤を、共有結合または非共有結合によって、固相、例えば、マイクロタイターブレートに固定する。非共有結合は、一般に、固体表面を、突然変異体SMOタンパク質または候補のヘッジホッグシグナル伝達薬剤の溶液でコーティングし、乾燥させることによって達成される。あるいは、固定される突然変異体SMOの標的部位に特異的な固定した抗体、例えば、モノクローナル抗体を使用して、それを固体表面に固着させることができる。このアッセイは、検出可能な標識によって標識してもよい固定されていない成分を、固定された成分、例えば、固着した成分を含むコーティングした表面に加えることによって実行し得る。反応が完了したら、未反応成分を、例えば洗浄によって除去してもよく、固体表面に固着した複合体を検出する。元は固定されていなかった成分が検出可能な標識を担持する場合、表面に固定された標識の検出は、複合体化が生じたことを示す。元は固定されていなかった成分が標識を担持しない場合、複合体化は、例えば、固定された複合体に特異的に結合する標識した抗体を使用することによって検出することができる。

20

## 【0340】

候補のヘッジホッグ経路阻害剤が、本明細書で同定するヘッジホッグシグナル伝達ポリペプチドと相互作用するが、それと直接的に結合しない場合、そのポリペプチドとのその相互作用は、タンパク質-タンパク質相互作用を検出するための周知の方法によってアッセイし得る。そのようなアッセイには、例えば、架橋、免疫共沈降、及び勾配またはクロマトグラフィーカラムを通した共精製などの伝統的な手法が含まれる。さらに、タンパク質-タンパク質相互作用は、Fields及び共同研究者ら (Fields and Song, *Nature* (London) 340: 245-246 (1989)、Chien et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 9578-9582 (1991) ) によって記載され、Chevray and Nathans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 5789-5793 (1991) によって開示されているように、酵母系遺伝子を使用してモニタリングすることができる。酵母GAL4などの多くの転写活性剤は、2つの物理的に個別の分子ドメインからなり、一方はDNA結合ドメインとして作用し、もう一方は転写活性ドメインとして機能する。前述の出版物に記載されている酵母発現系（一般に「2ハイブリッド系（two-hybrid system）」と称される）は、この特性を活用し、標的タンパク質がGAL4のDNA結合ドメインに融合するものと、候補の活性化タンパク質が活性化ドメインに融合するものという、2つのハイブリッドタンパク質を用いる。GAL4活性化プロモーターの制御下にあるGAL1-LacZレポーター遺伝子の発現は、タンパク質-タンパク質相互作用を介したGAL4活性の再構成に依存する。相互作用しているポリペプチドを含むコロニーは、-ガラクトシダーゼの発色基質を用いて検出する。2ハイブリッド技法を使用して2つの特異的タンパク質間のタンパク質-タンパク質相互作用を同定するための完全なキット（MATCHMAKER（商標））は、Clontechから市販されている。このシステムは、特異的なタンパク質の相互作用に関与するタンパク質ド

30

40

50

メインをマッピングすること、及びこれらの相互作用に不可欠なアミノ酸残基を突き止めることにも拡大可能である。

【0341】

アッセイは、当技術分野で十分に特徴付けられている、タンパク質・タンパク質結合アッセイ、生化学スクリーニングアッセイ、免疫アッセイ、及び細胞に基づくアッセイを含む、様々な形式で行うことができる。

【0342】

ヘッジホッグシグナル伝達ポリペプチドと他の細胞内または細胞外成分（例えば、Co <sub>st a 1 - 2</sub>）との相互作用に干渉する薬剤は、当業者に周知の手段によって試験することができる。いくつかの実施形態では、突然変異体SMOポリペプチド及び細胞内または細胞外成分を含有する反応混合物は、2つの産生物の相互作用及び結合を可能にする条件下及び時間で調製する。いくつかの実施形態では、候補化合物が結合を阻害する能力を試験するために、試験化合物の非存在下及び存在下で反応を実行する。加えて、第3の反応混合物にプラセボを加えて陽性対照として働かせてよい。混合物中に存在する試験化合物と細胞内または細胞外成分との間の結合（複合体形成）を本明細書において上に記載したようにモニタリングする。対照反応（複数可）において生じるが試験薬剤を含有する反応混合物では生じない複合体の形成は、試験薬剤が試験化合物とその反応パートナーとの相互作用に干渉することを示す。

【0343】

本開示は、前述のアッセイステップのいずれか1つまたは組み合わせを使用してヘッジホッグシグナル経路阻害剤を同定するための方法を企図している。換言すると、様々なスクリーニングアッセイを組み合わせて、例えば、特定の活性を有するアンタゴニストを特定するか、または1つのアッセイにおいて突然変異体SMOに拮抗する薬剤が、独立したアッセイにおいてもヘッジホッグシグナル伝達を阻害することを確認することができる。いずれの特定アッセイまたは方法についても、結果を、陽性及び/または陰性対照を含む1つ以上の適切な対照と比較し得る。

【0344】

ヘッジホッグ経路阻害剤をスクリーニング及び/または同定するための前述のアッセイ方法のいずれについても、薬剤は、単独またはプールでスクリーニングし得る。薬剤は、薬剤のライブラリー、または候補薬剤のセットからスクリーニングしてもよい。スクリーニングし得る好適な薬剤には、限定されないが、抗体、抗体断片、ペプチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、RNAi、及び小分子（例えば、プロモドメイン阻害剤）が含まれる。

【0345】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示のスクリーニング方法のいずれかで使用される細胞は、遺伝子中に1つ以上の突然変異を含み、これがヘッジホッグシグナル伝達の活性化または増加をもたらす。いくつかの実施形態では、この1つ以上の突然変異は、patched遺伝子におけるものであり、機能のpatched喪失をもたらす。いくつかの実施形態では、patched遺伝子におけるこの1つ以上の突然変異は、以下の突然変異のうちの1つ以上を有するタンパク質をコードする突然変異体遺伝子をもたらす：S616G、fs251、E380\*、Q853\*、W926\*、P1387S、s p 2667、Q501H、fs1017、fs108、またはA1380V。

【0346】

いくつかの実施形態では、ヘッジホッグシグナル伝達の活性化または増加をもたらす遺伝子における1つ以上の突然変異は、スムースンドにおけるものであり、細胞はスムースンド突然変異を有する。いくつかの実施形態では、スムースンド突然変異は、スムースンド機能獲得型突然変異である。いくつかの実施形態では、機能獲得型スムースンド突然変異は、構成的に活性なスムースンドタンパク質をもたらす。例えば、各々参照により本明細書に組み込まれるWO2011/028950及びWO2012047968を参照されたい。いくつかの実施形態では、スムースンド突然変異は、配列番号1の位置535に

10

20

30

40

50

対応する位置での突然変異である。ある特定の実施形態では、突然変異は、配列番号1の位置562に対応する位置での突然変異である。ある特定の実施形態では、突然変異は、位置535での、または配列番号1におけるその対応する位置でのW535Lである。いくつかの実施形態では、スムースンド突然変異は、配列番号1のR562Qに対応する突然変異（位置562での、または配列番号1の位置562に対応する位置でのR562Q突然変異）である。いくつかの実施形態では、スムースンド突然変異は、配列番号1の位置412に対応する位置での突然変異、例えば、配列番号1のそのような位置でのL412Fである。いくつかの実施形態では、スムースンド突然変異は、それをある特定のスムースンド阻害剤に対して耐性にする代替の突然変異を有する。いくつかの実施形態では、スムースンドタンパク質は、配列番号1のアミノ酸位置518で、または配列番号1の位置518に対応する位置で、アミノ酸変化を含む。いくつかの実施形態では、アミノ酸変化は、配列番号1のアミノ酸位置518に対応するアミノ酸位置でのE518KまたはE518A置換である。いくつかの実施形態では、スムースンドタンパク質は、配列番号1のアミノ酸位置473で、または配列番号1の位置473に対応する位置で、アミノ酸変化を含む。

10

## 【0347】

いくつかの実施形態では、この1つ以上の突然変異は、ヘッジホッグ遺伝子におけるものであり、ヘッジホッグタンパク質の過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、過剰発現したヘッジホッグタンパク質は、ソニックヘッジホッグタンパク質である。いくつかの実施形態では、過剰発現したヘッジホッグタンパク質は、インディアンヘッジホッグタンパク質である。いくつかの実施形態では、過剰発現したヘッジホッグタンパク質は、デザートヘッジホッグタンパク質である。

20

## 【0348】

いくつかの実施形態では、その1つ以上の突然変異は、サブレッサー・オブ・フューズドにおけるものであり、細胞は、サブレッサー・オブ・フューズド（S u F uまたはS U F U）機能喪失を有する。いくつかの実施形態では、結果は、S u F u活性における機能喪失をもたらす。いくつかの実施形態では、S u F u突然変異は、髄芽細胞腫、髄膜腫、腺様囊胞癌、基底細胞癌、及び横紋筋肉腫癌細胞におけるものである。いくつかの実施形態では、S u F u突然変異は、全体が本明細書に組み込まれるBrugieres et al. , 2012, JCO, 30(17) : 2087-2093に記載されている突然変異のうちのいずれかである。いくつかの実施形態では、S u F u突然変異は、表1もしくは2に記載の突然変異のいずれか、または全体が本明細書に組み込まれるBrugieres et al. , 2012, JCO, 30(17) : 2087-2093に記載されている突然変異のうちのいずれかである。

30

## 【表2-1】

表1：生殖系列SUFU突然変異

MBの診断時 の年齢	組織学的サブ タイプ	関連症状	突然変異の 継承	突然変異
4歳	線維形成	発達遅延	N/A	10qにて連続遺伝 子の喪失
		前頭隆起、隔離症		I V S 1-1A→T

40

## 【表2-2】

NA	線維形成	なし	NA	143 i n s A	
NA	線維形成	照射野内の髄膜腫	NA		
8カ月	MBEN	大頭症、手掌足底小陥 凹 (p a l m a r a n d p l a n t a r p i t s)	継承	c. 1022+1G>A	
1カ月未満	MBEN	なし	継承	c. 72 d e l C	10
3カ月未満	MBEN	なし	継承	c. 72 d e l C	
1カ月未満	MBEN	なし	継承	c. 72 i n s C	
6~12カ月	線維形成／結 節性	なし	継承	c. 72 i n s C	
6カ月未満	線維形成／結 節性	なし	継承	c. 72 i n s C	20
12~24カ月	MB NOS	なし	継承	c. 72 i n s C	
22カ月	線維形成／結 節性	なし	NA	c. 846 i n s C	
23カ月	線維形成／結 節性	なし	NA	c. 1022+1G>A	

## 【0349】

30

略記：MB、髄芽細胞腫；MBEN、大規模な小結節形成を伴うMB；NA、該当なし；NOS、特定不能。

## 【表3】

表2 生殖系列病因性S U F U突然変異

エクソン/ノイ	突然変異の種類	ヌクレオチド変化	コンセクエンス (腫瘍分析)	
ントロン		(配列番号44中)	配列番号43中)	
イントロン1	スプライス→ フレームシフト	c. 182+3A>T	p. T h r 55 f s	該当なし
エクソン2	フレームシフト	c. 294_295 d u p C T	p. T y r 99 f s	該当なし
イントロン2	スプライス→ フレームシフト	c. 318-10 d e 1 T	p. P h e 107 f s	野生型対立遺 伝子の喪失
エクソン3	大きな重複	c. 318-?_454 +? d u p	p. G l u 106- ?_G l u 152+ ? d u p	UV (c. 102 2+5G>A)
エクソン3	ミスセンス	c. 422 T>G	p. M e t 141 A r g	該当なし
エクソン9	ノンセンス	c. 1123 C>T	p. G l n 375 X	該当なし
エクソン9	フレームシフト	c. 1149_1150 d u p C T	p. C y s 384 f s	野生型対立遺 伝子の喪失
イントロン10	スプライス→ フレームシフト	c. 1297-1 G> C	p. ?	該当なし

## 【0350】

略記：UV、未知の変異体 (u n k n o w n v a r i a n t)。

## 【0351】

いくつかの実施形態では、S u F u 突然変異は、配列番号10における以下のアミノ酸位置のいずれかに対応する位置で突然変異を含む：位置15、184、123、295、187。ある特定の実施形態では、S u F u 突然変異は、P 15 L、Q 184 X、R 123 C、L 295 f s、またはP 187 Lのうちの1つ以上を含み、この突然変異は、その位置、または配列番号10における前述の位置に対応する位置にある。いくつかの実施形態では、S u F U 突然変異は、配列番号11のc. 1022+1 G>A (I V S 8 - 1 G>T)、c. 72 d e l C、c. 72 i n s C、143 i n s A、c. 846 i n s C、またはI V S 1 - 1 A - > Tに対応する突然変異のうちのいずれかである。いくつかの実施形態では、S u F u 突然変異は、T a y l o r e t a l (2002) N a t G e n e t 31:306-310 (例えば、I V S 8 - 1 G>T (=c. 1022+1 G>A)、1129 d e l, P 15 L、及びN g の2つ (a l l + L O H) ) ; S l a d e e t a l (2011) F a m C a n c e r 10:337-342, 2011 (例え

10

20

30

40

50

ば、c.1022+1G>A；c.848insC)；Pastorino et al (2009) Am J Med Genet A 149A:1539-1543(例えば、c.1022+1G>A)；Ng et al (2005) Am J Med Genet A 134:399-403(例えば、143insA；IVS1-1A>T)；Kijima et al (2012) Fam Cancer 11:565-70(例えば、c.550C>T(Q184X))；Aviikko et al (2012) Am J Hum Genet 91:520-526(例えば、c.367C>T(R123C))；Stephens et al (2013) J Clin Invest 123:2965-2968(例えば、x881\_882insG(L295fs))；またはReifenerger et al (2005) Brit J Dermatology 152:43-51(例えば、c560C>T(P187L))に記載されている突然変異のいずれかである。  
10

### 【0352】

いくつかの実施形態では、細胞はヒト細胞であり、染色体10重複及び／または10qの一部分の欠失を有し、該部分はSUFU及びPTENを含有する。いくつかの実施形態では、細胞は、Fs1017 SUFU突然変異を含む。

### 【0353】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のスクリーニング方法のいずれかで使用される細胞は、ヘッジホッグシグナル伝達経路が活性な細胞である。いくつかの実施形態では、本細胞は、ヘッジホッグシグナル伝達経路が構成的に活性な細胞である。いくつかの実施形態では、本細胞は、ヘッジホッグタンパク質またはヘッジホッグアゴニストによって刺激されている細胞である。いくつかの実施形態では、細胞におけるヘッジホッグ経路の活性は、Gli1-ルシフェラーゼレポーターアッセイにおいてGli1レベルまたは活性をモニタリングすることによって決定される。  
20

### 【0354】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のスクリーニング方法のいずれかで使用される細胞は、培養細胞である。いくつかの実施形態では、本開示は、複数の細胞を含む培養物を接触させることを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、本細胞は脊椎動物中にある。いくつかの実施形態では、本細胞は哺乳動物中にあり、細胞を接触させることは、ヘッジホッグシグナル伝達阻害剤をこの哺乳動物に投与することを含む。いくつかの実施形態では、哺乳動物はヒト対象である。いくつかの実施形態では、本細胞は癌細胞であり、かつ／または哺乳動物は癌と診断された哺乳動物である。いくつかの実施形態では、癌細胞は、結腸、肺、前立腺、皮膚、血液、肝臓、腎臓、乳房、膀胱、骨、脳、髄芽細胞腫、肉腫、基底細胞癌、胃、卵巣、食道、膵臓、または精巣癌細胞からなる群から選択される癌細胞である。いくつかの実施形態では、癌細胞は、髄芽細胞腫細胞、基底細胞癌細胞、または母斑性基底細胞癌細胞(ゴーリン症候群細胞)である。  
30

### 【0355】

ある特定の実施形態では、薬剤をヘッジホッグ経路阻害剤として同定したら、この薬剤を製剤化し、細胞または動物系アッセイにおいてさらに検査することができる。例えば、この薬剤を細胞または動物系癌モデルにおいて試験して、抗癌剤としての効力を検査することができる。  
40

### 【0356】

#### VII. 治療方法

いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書に記載のスムースンド突然変異のいずれかを有するスムースンドタンパク質を発現している細胞の分化段階、生存、及び／または増殖を調節する方法に関する。いくつかの実施形態では、細胞は対象(例えば、ヒト患者)中にある。いくつかの実施形態では、細胞は培養下にあり、本方法はインビトロ法を含む。ある特定の実施形態では、細胞は癌細胞である。ある特定の実施形態では、細胞は不要または異常な細胞増殖を特徴とする。いくつかの実施形態では、細胞は、本明細書に記載のスムースンド突然変異のいずれかを含むスムースンドタンパク質を含むか、またはそ  
50

れを発現することが事前に決定されている。ある特定の実施形態では、細胞は、配列番号1の241、281、408、459、469、533、及び／または535のうちのいずれか1つ以上に対応するアミノ酸で、野生型ヒトSMOに対する突然変異を含むスムースンドポリペプチドを発現することが事前に決定されている。いくつかの実施形態では、細胞は、配列番号1のT241M、W281C、I408V、A459V、C469Y、S533N、及び／またはW535Lに対応するアミノ酸での置換のいずれかを含むスムースンドポリペプチドを発現する。

#### 【0357】

いくつかの実施形態では、本開示は、細胞においてヘッジホッグシグナル伝達を低下させる方法であって、該細胞が、本明細書に記載のスムースンド突然変異のいずれかを有するスムースンドタンパク質を発現し、該細胞が、ヘッジホッグタンパク質に応答するか、またはヘッジホッグシグナル伝達経路遺伝子（例えば、ヘッジホッグシグナル伝達経路の成分）において1つ以上の突然変異を含み、その1つ以上の突然変異が、リガンドの非存在下で増加したヘッジホッグシグナル伝達及び／もしくはヘッジホッグシグナル伝達経路の活性化をもたらす、方法を提供し、本方法は、細胞を有効量のヘッジホッグ経路阻害剤である薬剤と接触させるステップを含む。いくつかの実施形態では、本薬剤は、突然変異体スムースンドタンパク質に選択的に結合し、それを阻害する化合物である。いくつかの実施形態では、本薬剤は、細胞において突然変異体スムースンドタンパク質の下流で作用するヘッジホッグシグナル伝達経路の成分を阻害する。他の実施形態では、本薬剤はプロモドメイン阻害剤である。

10

#### 【0358】

いくつかの実施形態では、本開示は、癌を有する対象を抗癌治療薬で治療する方法であって、該対象が、突然変異体SMOタンパク質を含み、かつ／またはそれを発現することが決定されており、該突然変異体SMOタンパク質が、配列番号1の位置239に対応する位置でアラニン以外のアミノ酸を有する、方法を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、細胞におけるヘッジホッグシグナル伝達を阻害する方法であって、この細胞が、配列番号1の位置239に対応する位置でアラニン以外のアミノ酸を有する突然変異体SMOタンパク質を発現する、方法を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、癌を有する対象を診断する方法であって、a) 対象から試料を得るステップ、b) 試料を、配列番号1の位置239に対応する位置でアラニン以外のアミノ酸を有する突然変異体SMOタンパク質をコードする核酸の存在について試験するステップであって、該試料が突然変異体SMOタンパク質を含む場合に、該対象が癌を有する、ステップと、を含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、癌は基底細胞癌である。いくつかの実施形態では、突然変異体SMOタンパク質は、配列番号1のアミノ酸位置239に対応するアミノ酸位置でパリンを有する。

20

#### 【0359】

いくつかの実施形態では、本開示は、細胞の不要な成長、増殖、または生存を阻害する方法であって、該細胞が、本明細書に記載のスムースンド突然変異のいずれかを有するスムースンドタンパク質を発現し、該細胞が、ヘッジホッグタンパク質に応答するか、またはヘッジホッグシグナル伝達経路遺伝子において1つ以上の突然変異を含み、その1つ以上の突然変異が、リガンドの非存在下で増加したヘッジホッグシグナル伝達及び／もしくはヘッジホッグシグナル伝達経路の活性化をもたらす、方法を提供し、本方法は、細胞を有効量のヘッジホッグ経路阻害剤である薬剤と接触させるステップを含む。いくつかの実施形態では、本薬剤は、突然変異体スムースンドタンパク質に選択的に結合し、それを阻害する薬剤である。いくつかの実施形態では、本薬剤は、細胞において突然変異体スムースンドタンパク質の下流で作用するヘッジホッグシグナル伝達経路の成分を阻害する。いくつかの実施形態では、本薬剤はプロモドメイン阻害剤である。

30

#### 【0360】

いくつかの実施形態では、本開示は、腫瘍細胞の成長、増殖、または生存を阻害する方法であって、腫瘍細胞が、本明細書に記載のスムースンド突然変異のいずれかを有するス

40

50

ムースンドタンパク質を発現し、該細胞が、ヘッジホッゲタンパク質に応答するか、またはヘッジホッゲシグナル伝達経路遺伝子において1つ以上の突然変異を含み、その1つ以上の突然変異が、リガンドの非存在下で増加したヘッジホッゲシグナル伝達及び/もしくはヘッジホッゲシグナル伝達経路の活性化をもたらす、方法を提供し、本方法は、細胞を有効量のヘッジホッゲ経路阻害剤である薬剤と接触させるステップを含む。いくつかの実施形態では、本薬剤は、突然変異体スムースンドタンパク質に選択的に結合し、それを阻害する薬剤である。いくつかの実施形態では、本薬剤は、細胞において突然変異体スムースンドタンパク質の下流で作用するヘッジホッゲシグナル伝達経路の成分を阻害する。他の実施形態では、本薬剤はプロモドメイン阻害剤である。いくつかの実施形態では、本方法は、薬剤を、それを必要としている患者に投与することを含む。

10

## 【0361】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示の方法のいずれかを用いて処理した細胞は、遺伝子中に1つ以上の突然変異を含み、これがヘッジホッゲシグナル伝達の活性化または増加をもたらす。いくつかの実施形態では、この1つ以上の突然変異は、patched遺伝子におけるものであり、機能のpatched喪失をもたらす。いくつかの実施形態では、patched遺伝子におけるこの1つ以上の突然変異は、以下の突然変異のうちの1つ以上を有するタンパク質をコードする突然変異体遺伝子をもたらす：S616G、fs251、E380\*、Q853\*、W926\*、P1387S、sp2667、Q501H、fs1017、fs108、またはA1380V。

20

## 【0362】

いくつかの実施形態では、ヘッジホッゲシグナル伝達の活性化または増加をもたらす遺伝子における1つ以上の突然変異は、スムースンドにおけるものであり、細胞はスムースンド突然変異を有する。いくつかの実施形態では、スムースンド突然変異は、スムースンド機能獲得型突然変異である。いくつかの実施形態では、機能獲得型スムースンド突然変異は、構成的に活性なスムースンドタンパク質をもたらす。例えば、各々参照により本明細書に組み込まれるWO2011/028950及びWO2012047968を参照されたい。いくつかの実施形態では、スムースンド突然変異は、配列番号1の位置535に対応する位置での突然変異である。ある特定の実施形態では、突然変異は、配列番号1の位置562に対応する位置での突然変異である。ある特定の実施形態では、突然変異は、位置535での、または配列番号1におけるその対応する位置でのW535Lである。いくつかの実施形態では、スムースンド突然変異は、配列番号1のR562Qに対応する突然変異（位置562での、または配列番号1の位置562に対応する位置でのR562Q突然変異）である。いくつかの実施形態では、スムースンド突然変異は、配列番号1の位置412に対応する位置での突然変異、例えば、配列番号1のそのような位置でのL412Fである。いくつかの実施形態では、スムースンド突然変異は、それを有する特定のスムースンド阻害剤に対して耐性にする代替の突然変異を有する。いくつかの実施形態では、スムースンドタンパク質は、配列番号1のアミノ酸位置518で、または配列番号1の位置518に対応する位置で、アミノ酸変化を含む。いくつかの実施形態では、アミノ酸変化は、配列番号1のアミノ酸位置518に対応するアミノ酸位置でのE518KまたはE518A置換である。いくつかの実施形態では、スムースンドタンパク質は、配列番号1のアミノ酸位置473で、または配列番号1の位置473に対応する位置で、アミノ酸変化を含む。

30

## 【0363】

いくつかの実施形態では、この1つ以上の突然変異は、ヘッジホッゲ遺伝子におけるものであり、ヘッジホッゲタンパク質の過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、過剰発現したヘッジホッゲタンパク質は、ソニックヘッジホッゲタンパク質である。いくつかの実施形態では、過剰発現したヘッジホッゲタンパク質は、インディアンヘッジホッゲタンパク質である。いくつかの実施形態では、過剰発現したヘッジホッゲタンパク質は、デザートヘッジホッゲタンパク質である。

40

## 【0364】

50

いくつかの実施形態では、その1つ以上の突然変異は、サプレッサー・オブ・フェーズドにおけるものであり、細胞は、サプレッサー・オブ・フェーズド（S u F u または S U F U）機能喪失を有する。いくつかの実施形態では、結果は、S u F u 活性における機能喪失をもたらす。いくつかの実施形態では、S u F u 突然変異は、髄芽細胞腫、髄膜腫、腺様囊胞癌、基底細胞癌、及び横紋筋肉腫癌細胞におけるものである。いくつかの実施形態では、S u F u 突然変異は、全体が本明細書に組み込まれるBrugieres et al. , 2012, JCO, 30(17): 2087-2093に記載されている突然変異のうちのいずれかである。

【0365】

いくつかの実施形態では、S u F u 突然変異は、表1もしくは2に記載の突然変異のいずれか、または全体が本明細書に組み込まれるBrugieres et al. , 2012, JCO, 30(17): 2087-2093に記載されている突然変異のうちのいずれかである。

## 【表4】

表1：生殖系列S U F U突然変異

MBの診断時 の年齢	組織学的サブ タイプ	関連症状	突然変異の 継承	突然変異
4歳	線維形成	発達遅延 前頭隆起、隔離症	N A	10qにて連続遺伝子 の喪失 I V S 1-1A→T
N A	線維形成	なし	N A	143 i n s A
N A	線維形成	照射野内の髄膜腫	N A	
8カ月	MB E N	大頭症、手掌足底小陥凹 (p a l m a r a n d p l a n t a r p i t s)	継承	c. 1022+1G>A
1カ月未満	MB E N	なし	継承	c. 72 d e 1 C
3カ月未満	MB E N	なし	継承	c. 72 d e 1 C
1カ月未満	MB E N	なし	継承	c. 72 i n s C
6~12カ月	線維形成／結 節性	なし	継承	c. 72 i n s C
6カ月未満	線維形成／結 節性	なし	継承	c. 72 i n s C
12~24カ月	MB N O S	なし	継承	c. 72 i n s C
22カ月	線維形成／結 節性	なし	N A	c. 846 i n s C
23カ月	線維形成／結 節性	なし	N A	c. 1022+1G>A

10

20

30

40

## 【0366】

略記：MB、髄芽細胞腫；MB E N、大規模な小結節形成を伴うMB；N A、該当なし；N O S、特定不能。

## 【表5】

表2 生殖系列病因性SUFU突然変異

エクソン／イ ントロン	突然変異の種類	ヌクレオチド変化 (配列番号44中)	コンセクエンス (腫瘍分析 配列番号43中)	
イントロン1	スプライス→ フレームシフト	c. 182+3A>T	p. Th r 55 f s	該当なし
エクソン2	フレームシフト	c. 294_295 d u p C T	p. Ty r 99 f s	該当なし
イントロン2	スプライス→ フレームシフト	c. 318-10 d e 1 T	p. Ph e 107 f s	野生型対立遺 伝子の喪失
エクソン3	大きな重複	c. 318-?_454 +? d u p	p. G 1 u 106- ?_G 1 u 152+ ? d u p	UV (c. 102 2+5G>A)
エクソン3	ミスセンス	c. 422 T>G r g	p. Met 141 A	該当なし
エクソン9	ノンセンス	c. 1123 C>T	p. Gl n 375 X	該当なし
エクソン9	フレームシフト	c. 1149_1150 d u p C T	p. Cy s 384 f s	野生型対立遺 伝子の喪失
イントロン10	スプライス→ フレームシフト	c. 1297-1 G> C	p. ?	該当なし

## 【0367】

略記: UV、未知の変異体 (u n k n o w n v a r i a n t)。

## 【0368】

いくつかの実施形態では、SUFU突然変異は、配列番号10における以下のアミノ酸位置のいずれかに対応する位置で突然変異を含む：位置15、184、123、295、187。ある特定の実施形態では、SUFU突然変異は、P15L、Q184X、R123C、L295fs、またはP187Lのうちの1つ以上を含み、この突然変異は、その位置、または配列番号10における前述の位置に対応する位置にある。いくつかの実施形態では、SUFU突然変異は、配列番号11のc. 1022+1G>A (IVS8-1G>T)、c. 72delC、c. 72insC、143insA、c. 846insC、またはIVS1-1A->Tに対応する突然変異のうちのいずれかである。いくつかの実施形態では、SUFU突然変異は、Taylor et al (2002) Nat Genet 31: 306-310 (例えば、IVS8-1G>T (=c. 1022+1G>A)、1129del, P15L、及びNgの2つ (a 11+LOH) ) ; Slade 40

et al (2011) Fam Cancer 10: 337 - 342, 2011 (例えば、c. 1022 + 1 G > A; c. 848 ins C); Pastorino et al (2009) Am J Med Genet A 149A: 1539 - 1543 (例えば、c. 1022 + 1 G > A); Ng et al (2005) Am J Med Genet A 134: 399 - 403 (例えば、143 ins A; IVS1 - 1 A > T); Kijima et al (2012) Fam Cancer 11: 565 - 70 (例えば、c. 550 C > T (Q184X)); Aavikko et al (2012) Am J Hum Genet 91: 520 - 526 (例えば、c. 367 C > T (R123C)); Stephens et al (2013) J Clin Invest 123: 2965 - 2968 (例えば、x881\_882 ins G (L295fs)); または Reifenberger et al (2005) Brit J Dermatology 152: 43 - 51 (例えば、c560 C > T (P187L)) に記載されている突然変異のいずれかである。

#### 【0369】

いくつかの実施形態では、細胞はヒト細胞であり、染色体 10 重複及び / または 10q の一部分の欠失を有し、該部分は S U F U 及び P T E N を含有する。いくつかの実施形態では、細胞は、F s 1 0 1 7 S U F U 突然変異を含む。

#### 【0370】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法のいずれかで処理される細胞は、ヘッジホッギナル伝達経路が活性な細胞である。いくつかの実施形態では、本細胞は、ヘッジホッギナル伝達経路が構成的に活性な細胞である。いくつかの実施形態では、本細胞は、ヘッジホッギタンパク質またはヘッジホッガゴニストによって刺激されている細胞である。いくつかの実施形態では、細胞におけるヘッジホッギ経路の活性は、G 1 i - ルシフェラーゼレポーター アッセイにおいて G 1 i 1 レベルまたは活性をモニタリングすることによって決定される。

#### 【0371】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法のいずれかで処理される細胞は、培養細胞である。いくつかの実施形態では、本開示は、複数の細胞を含む培養物を接触させることを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、本細胞は脊椎動物中にある。いくつかの実施形態では、本細胞は哺乳動物中にあり、細胞を接触させることは、ヘッジホッギナル伝達阻害剤をこの哺乳動物に投与することを含む。いくつかの実施形態では、哺乳動物はヒト対象である。いくつかの実施形態では、本細胞は癌細胞であり、かつ / または哺乳動物は癌と診断された哺乳動物である。いくつかの実施形態では、癌細胞は、結腸、肺、前立腺、皮膚、血液、肝臓、腎臓、乳房、膀胱、骨、脳、髄芽細胞腫、肉腫、基底細胞癌、胃、卵巣、食道、膵臓、または精巣癌細胞からなる群から選択される癌細胞である。いくつかの実施形態では、癌細胞は、髄芽細胞腫細胞、基底細胞癌細胞、または母斑性基底細胞癌細胞 (ゴーリン症候群細胞) である。

#### 【0372】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示の方法のうちのいずれかで使用されるヘッジホッギ経路阻害剤は、本明細書に記載の突然変異体スムースンドタンパク質のうちのいずれかの発現を阻害するポリヌクレオチド分子である。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド分子は、本明細書に開示の突然変異体スムースンドタンパク質のうちのいずれかをコードする核酸に特異的にハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、アンチセンス分子は、野生型スムースンドタンパク質をコードする核酸 (例えば、配列番号 1 の配列を有するタンパク質をコードする核酸) にハイブリダイズしない。いくつかの実施形態では、ヘッジホッギ経路阻害剤は、本明細書に開示の突然変異体スムースンドポリペプチドのいずれかをコードする mRNA 転写産物を標的にする RNAi アンタゴニストである。いくつかの実施形態では、RNAi アンタゴニストは siRNA である。いくつかの実施形態では、siRNA は、長さが 19 ~ 23 ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、siRNA は、二本鎖であり、一端または両

10

20

30

40

50

端で短い突出（複数可）を含む。いくつかの実施形態では、s i R N Aは、本明細書に開示の突然変異体スムースンドポリペプチドのいずれかをコードするm R N A転写産物を標的にする。いくつかの実施形態では、R N A iまたはs i R N Aは、野生型スムースンドタンパク質をコードするm R N A転写産物（例えば、配列番号1の配列を有するタンパク質をコードする核酸）を標的にしない。いくつかの実施形態では、R N A iは、s h R N Aを含む。

#### 【0373】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示の方法のうちのいずれかで使用されるヘッジホッグ経路阻害剤は、本明細書に記載の突然変異体スムースンドポリペプチドのうちのいずれかに特異的に結合する小分子である。いくつかの実施形態では、小分子は、ヘッジホッグシグナル伝達経路においてスムースンドの下流で作用するポリペプチドに結合する。いくつかの実施形態では、小分子は、ヘッジホッグシグナル伝達経路とは明白に異なる経路においてポリペプチドに結合する。いくつかの実施形態では、小分子はプロモドメイン阻害剤である。いくつかの実施形態では、プロモドメイン阻害剤はB R D 4阻害剤である。いくつかの実施形態では、プロモドメイン阻害剤は、各々全体が本明細書に組み込まれる、Ciceri et al. , 2014, *Nature Chemical Biology*, 10:305-312、Muller et al. , 2014, *Med Chem Commun*, 5:288-296、Garnier et al. , 2014, 24(2):185-199に記載されているプロモドメイン阻害剤のうちのいずれかである。いくつかの実施形態では、プロモドメイン阻害剤は、I - B E T 762、J Q 1、J Q 2、B I - 2536及びT G - 101348によるB R D 4である。

10

20

20

#### 【0374】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示の方法のうちのいずれかで使用されるヘッジホッグ経路阻害剤は、本明細書に記載の突然変異体スムースンドポリペプチドのうちのいずれかに特異的に結合する抗体である。いくつかの実施形態では、抗体は、ヘッジホッグシグナル伝達経路においてスムースンドの下流で作用するポリペプチドに結合する。いくつかの実施形態では、抗体はモノクローナル抗体である。

#### 【0375】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法のいずれかに従って薬剤と接触させた細胞は、ヘッジホッグシグナル伝達経路のさらなる阻害剤（例えば、H P I）とも接触させる。いくつかの実施形態では、ヘッジホッグシグナル伝達経路のさらなる阻害剤は、ベラトラム（v e r a t r u m）型のステロイド系アルカロイドである。いくつかの実施形態では、このベラトラム型のステロイド系アルカロイドは、シクロパミン、またはK A A D - シクロパミンもしくはその任意の機能的誘導体（例えば、I P I - 269609またはI P I - 926）である。いくつかの実施形態では、ベラトラム型のステロイド系アルカロイドは、ジェルビンまたはその任意の機能的誘導体である。いくつかの実施形態では、さらなる阻害剤は、ビスマデギブ、ソニデギブ、B M S - 833923、P F - 04449913、もしくはL Y 2940680、またはそれらの任意の機能的誘導体である。いくつかの実施形態では、さらなる阻害剤は、ベラトラムアルカロイドまたはビスマデギブに化学的に関係していないスムースンド阻害剤であり、これには、限定されないが、ソニデギブ、B M S - 833923、P F - 04449913、L Y 2940680、エリベッジ、B M S - 833923 (X L 319)、L D E 225（エリスモデギブ（E r i s m o d e g i b））、P F - 04449913、N V P - L D E 225、N V P - L E Q 506、T A K - 441、X L - 319、L Y - 2940680、S E N 450、イトラコナゾール、M R T - 10、M R T - 83、またはP F - 04449913が含まれる。いくつかの実施形態では、さらなる阻害剤は、A m a k y e , et al. , *Nature Medicine*, 19(11):1410-1422（その全体が本明細書に組み込まれる）に開示されている化合物のうちのいずれかである。いくつかの実施形態では、ヘッジホッグシグナル伝達経路のさらなる阻害剤は抗体である。いくつかの実施形態では、本抗体は、ヘッジホッグタンパク質に結合する、例えば、特異的に結合する抗体であ

30

40

50

る。いくつかの実施形態では、ヘッジホッグシグナル伝達経路のさらなる阻害剤はRNAiアンタゴニストである。

【0376】

治療または診断を必要とする対象には、異常なヘッジホッグシグナル伝達を既に有する対象、及び異常なヘッジホッグシグナル伝達を有する傾向にある対象、またはそれが予防される対象が含まれる。例えば、対象は、本開示の方法に従って、ヘッジホッグ経路阻害剤を受けた後で、患者が以下のうちの1つ以上の観察可能及び/または測定可能な低下または不在を示す場合に、異常なヘッジホッグシグナル伝達についてうまく「治療される」：腫瘍細胞の数の低下もしくはそのような細胞の不在；腫瘍サイズの低下；軟組織及び骨への癌の蔓延を含む周辺器官への腫瘍細胞浸潤の阻害（すなわち、ある程度の遅延、及びいくつかの実施形態では、停止）；腫瘍転移の阻害（すなわち、ある程度の遅延、及びいくつかの実施形態では、停止）；腫瘍成長のある程度の阻害；ならびに/または特定の癌と関連する症状のうちの1つ以上のある程度の緩和；低下した罹患率及び死亡率、ならびに生活の質の問題の改善。そのようなヘッジホッグ経路阻害剤は、既存の癌細胞の成長を防止し、かつ/またはそれを殺滅し得る範囲で、細胞増殖抑制性及び/または細胞傷害性であり得る。これらの兆候または症状の低下は、患者によっても感じられ得る。さらに、ヘッジホッグ経路阻害剤への曝露の成功は（特に、腫瘍応答が測定可能でない場合）、皮膚穿孔生検または毛包のいずれかにおけるG1i1発現によってモニタリングすることができる（ビスマデギブについて行われる通り）。

【0377】

ある特定の実施形態では、本明細書に開示のヘッジホッグ経路阻害剤のうちのいずれかによる治療を受けた対象は、ビスマデギブに対して耐性である突然変異体スムースンドタンパク質を発現する。いくつかの実施形態では、対象は、本明細書に記載のスムースンド突然変異のうちのいずれかを含むスムースンドタンパク質を発現する。ある特定の実施形態では、対象は、配列番号1の241、281、408、459、469、533、及び/または535のうちのいずれか1つ以上に対応するアミノ酸位置で突然変異を含むスムースンドポリペプチドを発現する。いくつかの実施形態では、対象は、配列番号1のT241M、W281C、I408V、A459V、C469Y、S533N、及び/またはW535Lに対応するアミノ酸位置での突然変異を含むスムースンドポリペプチドを発現する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の治療方法のいずれかによる治療の前に、対象は、本明細書に記載のスムースンド突然変異のうちのいずれかを含むスムースンドタンパク質を発現することが決定されている。ある特定の実施形態では、本明細書に記載の治療方法のいずれかによる治療の前に、対象は、配列番号1の241、281、408、459、469、533、及び/または535のうちのいずれか1つ以上に対応するアミノ酸で突然変異を含むスムースンドポリペプチドを発現することが決定されている。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の治療方法のいずれかによる治療の前に、対象は、配列番号1のT241M、W281C、I408V、A459V、C469Y、S533N、及び/またはW535Lに対応するアミノ酸での突然変異を含むスムースンドポリペプチドを発現することが決定されている。

【0378】

疾患における成功した治療及び改善を評価するための上記のパラメータは、医師にはよく知られている慣習的な手順によって容易に測定可能である。癌治療については、例えば、疾患無増悪期間（TTT）を評価すること及び/または奏功率（RR）を決定することによって、効力を測定することができる。転移は、病期分類試験、ならびに転移の程度を決定するためのカルシウムレベル及び他の酵素についての試験によって決定することができる。CTスキャンを行って、腫瘍または癌の外の領域への蔓延を探すこともできる。予後判定、診断、及び/または治療のプロセスに関する本明細書に記載の開示は、例えば、G1i1発現の決定及び検査を伴う。

【0379】

疾患（例えば、癌）の治療、その症状の軽減、またはその診断を目的とした「哺乳動物

10

20

30

40

50

」は、ヒト、飼育動物及び家畜、ならびに動物園、競技、または愛玩動物、例えば、イヌ、ネコ、畜牛、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウサギ、フェレットなどを含む、哺乳動物として分類される任意の動物を指す。いくつかの実施形態では、哺乳動物はヒトである。いくつかの実施形態では、哺乳動物は出生後である。いくつかの実施形態では、哺乳動物は小児である。いくつかの実施形態では、哺乳動物は成体である。

#### 【0380】

1つ以上のさらなる治療薬と「組み合わせた」投与には、同時（並行）、及び任意の順序での連続投与が含まれる。

#### 【0381】

ある特定の実施形態では、ヘッジホッグ経路阻害剤は、本明細書に記載の癌のうちのいずれかから選択される癌、または腫瘍の1つ以上の細胞がヘッジホッグ経路成分において本明細書に記載の突然変異のうちのいずれかなどの突然変異を含む癌の治療に使用される。腫瘍は、あるレベルの不均一性を有し得る細胞を含むことが、一般に理解されるべきであり、本明細書で具体的に記述される。したがって、腫瘍中の全ての細胞が特定の有害な突然変異を含む必要はない。したがって、本開示は、治療される癌または腫瘍が、ヘッジホッグ経路の成分において本明細書に記載の突然変異のうちのいずれかなどの突然変異を有する細胞を（そのような突然変異が腫瘍の全細胞に存在する場合であっても）含む方法を企図している。

#### 【0382】

ヘッジホッグ経路阻害剤の使用は、罹患組織及び/または細胞が高いヘッジホッグ経路活性化を呈する障害を特異的に標的にし得ることがさらに企図されている。ヘッジホッグシグナル伝達経路によって活性化されるG1i1及びG1i2を含むG1i遺伝子の発現は、幅広い範囲または組織及び障害にわたってヘッジホッグシグナル伝達と最も一貫して相關する一方、G1i3はそれほどではない。G1i遺伝子は、ヘッジホッグシグナル伝達の完全な作用を誘発するために必要とされる多くの遺伝子の発現を活性化する転写因子をコードする。しかしながら、G1i3転写因子は、ヘッジホッグエフェクター遺伝子のリプレッサーとしても作用することができるため、G1i3の発現は、ヘッジホッグシグナル伝達経路の影響の減少を引き起こし得る。G1i3が転写活性物質として作用するのか、またはリプレッサーとして作用するのかは、翻訳後事象に依存するため、G1i3タンパク質の活性化形態（対抑制形態）を検出するための方法（ウェスタンプロットなど）もヘッジホッグ経路活性化の信頼性のある測定であることが予測される。G1i1遺伝子は、多様な癌、過形成、及び未熟肺において強く発現され、ヘッジホッグ経路の関係する活性化のためのマーカーとしての役割を果たす。さらに、高いG1i遺伝子発現を有する未熟肺などの組織は、ヘッジホッグ阻害剤によって強い影響を受ける。したがって、G1i遺伝子発現の検出は、ヘッジホッグアンタゴニストによる治療の利益を特に受けることになる組織及び疾患を同定するための強力な予測ツールとして使用し得ることが企図される。いくつかの実施形態では、G1i1発現レベルは、転写産物の直接的検出か、またはタンパク質レベルもしくは活性の検出のいずれかによって検出される。転写産物は、G1i1転写産物またはそれから合成されるcDNAに対するハイブリダイゼーションまたはプローブに主に依存する幅広い技法のいずれかを使用して検出し得る。周知の技法には、転写レベルのノーザンプロット、逆転写酵素PCR、及びマイクロアレイ分析が含まれる。G1iタンパク質レベルを検出するための方法には、ウェスタンプロット、免疫沈降、二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動（2D SDS-PAGE（いくつかの実施形態では、G1iタンパク質の位置が決定されている標準に対して比較する））、及び質量分析が含まれる。質量分析は、特定の試料中の多くの異なるタンパク質レベルのハイスクープロット同定を可能にするために、一連の精製ステップと組み合わせてもよい。質量分析及び2D SDS-PAGEは、タンパク質分解事象、ユビキチン化、リン酸化、脂質修飾などを含むタンパク質への翻訳後修飾を同定するために使用することもできる。G1i活性はまた、基質DNAへの結合または標的プロモーターのインビトロ転写活性化を分析することによって評価してもよい。ゲルシフトアッセイ、DNAフットプリントアッセイ、

10

20

30

40

50

及びDNA-タンパク質架橋アッセイは全て、DNA上のGU結合部位に結合することができるタンパク質の存在を評価するために使用し得る方法である。J. Mol. Med. 77(6):459-68(1999)、Cell 100(4):423-34(2000)、Development 127(19):4923-4301(2000)。

#### 【0383】

G1i1はヘッジホッグ活性化中に極めて普遍的に発現されるため、いかなる程度のG1i1過剰発現も、ヘッジホッグ経路阻害剤が有効な治療薬となることの決定に有用であるはずである。いくつかの実施形態では、G1i1は、正常な対照細胞/組織/対象よりも少なくとも2倍高いレベルで発現されるはずである。いくつかの実施形態では、G1i1発現は、正常な細胞/組織/対象よりも4、6、8、または10倍高い。

10

#### 【0384】

ある特定の実施形態では、G1i1転写レベルを測定し、異常に高いG1i1レベルを示す病変または障害組織をヘッジホッグ経路阻害剤で治療する。他の実施形態では、治療する状態は、治療する組織においてG1i1発現レベルの測定を行わなくても、ヘッジホッグ経路の異常な活性化との顕著な相関を有することが分かっている。未熟肺組織、肺癌(例えば、腺癌、気管支肺胞腺癌、小細胞癌腫)、乳癌(例えば、下位導管癌腫(inferior ductal carcinomas)、下位小葉癌腫(inferior lobular carcinomas)、管状腺癌腫)、前立腺癌(例えば、腺癌)、及び良性前立腺肥大は全て、ある特定の症例において激しく上昇したG1i1発現レベルを示す。したがって、G1i1発現レベルは、これらの組織のどれをヘッジホッグ経路阻害剤で治療するべきかを決定するための強力な診断手段である。さらに、尿路上皮細胞の癌(例えば、膀胱癌、他の泌尿生殖器癌)もある特定の症例において上昇したg1i-1レベルを有することになるという実質的に相關する証拠がある。例えば、染色体9q22上のヘテロ接合性の喪失が膀胱癌において一般的であることが知られている。Ptcch1遺伝子がこの位置に存在し、多くの他の癌種のように、Ptcch1機能喪失が恐らく過剰増殖の部分的な原因である。したがって、そのような癌は、高いG1i1発現を示し、ヘッジホッグアンタゴニストによる治療に特に適している。

20

#### 【0385】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載のヘッジホッグ経路阻害剤のうちのいずれかは、ptch-1及び/またはptch-2突然変異、例えば、patched-1またはpatched-2機能喪失突然変異を有する腫瘍を有する対象の治療に使用される。ptch-1及びptch-2の発現はまた、ヘッジホッグシグナル伝達経路によって活性化されるが、典型的にはg1i遺伝子と同じ程度までではなく、その結果、ヘッジホッグ経路活性化のマーカーとしてはg1i遺伝子に劣る。ある特定の組織において、発現されるのはptch-1またはptch-2の一方のみであるが、ヘッジホッグ経路は極めて活性である。例えば、精巣発生において、デザートヘッジホッグが重要な役割を果たし、ヘッジホッグ経路が活性化されるが、ptch-2のみが発現される。したがって、これらの遺伝子は、ヘッジホッグ経路活性化のためのマーカーとしては個々で信頼性を欠き得るが、両方の遺伝子の同時測定は、ヘッジホッグアンタゴニストによって治療される組織についてのより有用なインジケータとして企図される。

30

#### 【0386】

脊椎動物における分化した組織の順序立った空間的配置の形成へのヘッジホッグシグナル伝達の広範な関与を踏まえると、本開示のヘッジホッグ経路阻害剤は、インビトロとインビトとの両方で数々の異なる脊椎動物組織を生成及び/または維持するためのプロセスに使用し得る。本ヘッジホッグ経路阻害剤は、必要に応じて、上記の製剤のうちのいずれでもあり得る。

40

#### 【0387】

いくつかの実施形態では、本ヘッジホッグ経路阻害剤は、悪性髄芽細胞腫及び他の原発性CNS悪性神経外胚葉性腫瘍のための治療レジメンの一部として使用することができる。原発性脳腫瘍である髄芽細胞腫は、小児において最も一般的な脳腫瘍である。髄芽細胞

50

腫は、後頭蓋窩で生じる未分化神経外胚葉性（PNET）腫瘍である。これらは、全小児脳腫瘍の約25%を占める。組織学的には、これらは、真性ロゼットで一般的配列される小円形細胞腫瘍であるが、星状膠細胞、上衣細胞、またはニューロンへのいくらかの分化を示し得る。PNETは、松果体（松果体芽細胞腫）及び大脳を含む脳の他のエリアにおいて生じ得る。テント上領域において生じるこれらのものは、一般に、予後が悪化する。

## 【0388】

髓芽細胞腫 / PNETは、切除後にCNSのどこかで再発することが知られており、さらには骨に転移し得る。したがって、治療前検査は、「落とした転移」の可能性を排除するために、脊髄の検査を含むべきである。ガドリニウム増強MRIがこの目的での脊髄造影の大部分に取って代わっており、慣習的な手順としてCSF細胞診断を術後に得る。

10

## 【0389】

いくつかの実施形態では、本ヘッジホッグ経路阻害剤は、上衣腫に対する治療プログラムの一部として使用される。上衣腫は、小児における小児脳腫瘍の約10%を占める。全体的には、これらは、脳室の上衣内壁から生じ、ロゼット、カナル、及び血管周囲ロゼットを顕微鏡的に形成する腫瘍である。上衣腫を患うと報告された51人の小児のCHOPシリーズにおいて、3/4が組織学的に良性であり、約2/3が第4室の領域から生じ、1/3がテント上領域において提示された。提示時の年齢は、出生時から4歳がピークである。平均年齢は約5歳である。この疾患を患う非常に多くの小児が乳児であるため、彼らは多様な療法を必要とする。

20

## 【0390】

いくつかの実施形態では、本開示のヘッジホッグ経路阻害剤は、様々な腫瘍へのヘッジホッグシグナル伝達の関与、または発症中のそのような組織におけるヘッジホッグもしくはその受容体の発現に基づいて、異常調節されたヘッジホッグ活性を有する腫瘍の成長を阻害するために使用することができる。そのような腫瘍には、限定されないが、ゴーリン症候群に関する腫瘍（例えば、髓芽細胞腫、髓膜腫など）、ptch突然変異と関連する腫瘍（例えば、血管腫、横紋筋肉腫など）、Gli1増幅に起因する腫瘍（例えば、膠芽腫、肉腫など）、Smoo機能障害に起因する腫瘍（例えば、基底細胞癌など）、ptc相同体であるTRC8と結び付く腫瘍（例えば、腎癌腫、甲状腺癌腫など）、Extr-1関連腫瘍（例えば、骨癌など）、Sft/x誘導性腫瘍（例えば、肺癌、軟骨肉腫など）、ヘッジホッグタンパク質を過剰発現している腫瘍、及び他の腫瘍（例えば、乳癌、泌尿生殖器癌（例えば、腎臓、膀胱、尿管、前立腺など）、副腎癌、消化管癌（例えば、胃、小腸など）が含まれる。

30

## 【0391】

いくつかの実施形態では、本開示のヘッジホッグ経路阻害剤は、いくつかの形態の癌を治療するためにも使用し得る。これらの癌には、限定されないが、前立腺癌、膀胱癌、肺癌（小細胞及び非小細胞を含む）、結腸癌、腎臓癌、肝臓癌、乳癌、子宮頸癌、子宮内膜もしくは他の子宮癌、卵巣癌、精巣癌、陰茎の癌、膣の癌、尿道の癌、胆嚢癌、食道癌、または肺臓癌が含まれる。さらなる癌の種類には、骨格筋または平滑筋の癌、胃癌、小腸の癌、唾液腺の癌、肛門癌、直腸癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、下垂体癌、及び鼻咽頭癌が含まれる。本開示のヘッジホッグアンタゴニストで治療することができるさらなる例示的な癌の形態には、ヘッジホッグ発現細胞を含む癌が含まれる。本開示のヘッジホッグアンタゴニストで治療することができるまたさらなる例示的な癌の形態には、Gli1発現細胞を含む癌が含まれる。一実施形態では、癌は、patched-1における突然変異を特徴としない。いくつかの実施形態では、癌は、スムースンド及び/またはSufu突然変異を特徴とする。

40

## 【0392】

ある特定の実施形態では、ヘッジホッグ経路阻害剤を使用して、基底細胞癌を有する対象を治療してもよい。特定の実施形態では、基底細胞癌は母斑性基底細胞癌である。特定の実施形態では、対象はゴーリン症候群を有する。

50

## 【0393】

前述のものは、本開示のヘッジホッグ経路阻害剤のためのインビトロ及びインビボによる使用の单なる例である。ヘッジホッグ経路阻害剤はまた、突然変異体スムースンド生物活性を研究するため、突然変異体スムースンド及びその結合パートナーを様々な細胞及び組織から精製するため、ならびにヘッジホッグシグナル伝達経路のさらなる成分を同定するために、突然変異体スムースンドタンパク質（例えば、T 2 4 1 M、W 2 8 1 C、I 4 0 8 V、A 4 5 9 V、C 4 6 9 Y、S 5 3 3 N、及び／またはW 5 3 5 L 突然変異を有するスムースンドタンパク質）のための自然の標的または結合パートナーを同定することにおける使用に好適である。

#### 【0394】

ある特定の実施形態では、ヘッジホッグ経路阻害剤は、開示の抗体のうちのいずれかである。本開示の抗体は、例えば、インビトロ、エクスピボ、及びインビボの治療方法で使用し得る。一態様では、本開示は、インビボまたはインビトロのいずれかで、癌を治療し、不要な細胞増殖を阻害し、癌の転移を阻害し、かつ腫瘍細胞のアポトーシスを誘導する方法であって、抗体と突然変異体SMOとの結合が許容される条件下で、細胞を本開示の抗体に曝露することを含む、方法を提供する。特定の実施形態では、細胞は、骨髓性白血病細胞、肺癌細胞、胃癌細胞、乳癌細胞、前立腺癌細胞、腎細胞癌細胞、及び膠芽腫細胞である。一実施形態では、本開示の抗体は、突然変異体SMOの活性を阻害するために使用することができ、この方法は、突然変異体SMOの活性が阻害されるように、突然変異体SMOを本開示の抗体に曝露することを含む。

#### 【0395】

一態様では、本開示は、癌を治療する方法であって、個体に有効量の本開示の抗体を投与することを含む、方法を提供する。ある特定の実施形態では、癌を治療する方法は、個体に、本開示の抗体を含む有効量の医薬製剤と、任意に、以下に提供するものなどの、少なくとも1つの追加の治療剤とを投与することを含む。

#### 【0396】

本開示の抗体は、治療において単独でまたは他の組成物と組み合わせて使用することができる。例えば、本開示の抗体は、少なくとも1つの追加の治療剤及び／またはアジュvantと共に投与することができる。特定の実施形態では、追加の治療剤は、抗VEGF抗体である。

#### 【0397】

上述のそのような組合せ療法は、組合せ投与（この場合、2種以上の治療剤が同じまたは個別の製剤中に含まれる）及び個別投与を包含し、その場合、本開示の抗体の投与は、追加の治療剤及び／またはアジュvantの投与の前に、その投与と同時に、及び／またはその投与の後に起こることができる。本開示の抗体は、放射線療法と組み合わせて使用することもできる。

#### 【0398】

一実施形態では、本開示の抗体は、突然変異体SMOの発現及び／または活性の増大と関連する障害を患っている個体の突然変異体SMOに結合させる方法であって、個体の突然変異体SMOが結合されるように個体に抗体を投与することを含む、方法で使用される。一実施形態では、突然変異体SMOはヒト突然変異体SMOであり、個体はヒトである。

#### 【0399】

本開示の抗体（及び任意の追加の治療剤またはアジュvant）は、非経口、皮下、腹腔内、肺内、及び鼻腔内を含む任意の好適な手段によって、かつ所望する場合、局所的治療、病巣内投与のために投与することができる。非経口注入には、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、または皮下への投与が含まれる。さらに、抗体は、特に漸減用量の抗体を用いる、パルス注入によって好適に投与される。投与が短期間のものであるかまたは持続的なものであるかに一部依存して、投薬は、任意の好適な経路によるもの、例えば、静脈内または皮下注射などの注射によるものであることができる。

#### 【0400】

10

20

30

40

50

本開示の抗体の結合標的位置を、抗体の調製及び投与において考慮することができる。結合標的が細胞内分子である場合、本開示の特定の実施形態は、結合標的が位置する細胞に導入されるべき抗体またはその抗原結合断片を提供する。一実施形態では、本開示の抗体は、細胞内でイントラボディとして発現させることができる。本明細書で使用される「イントラボディ」という用語は、例えば、Marasco, Gene Therapy 4:11-15 (1997)、Kontermann, Methods 34:163-170 (2004)、米国特許第6,004,940号及び第6,329,173号；米国特許出願公開第2003/0104402号、ならびにPCT公開第WO2003/077945号に記載されているような、細胞内で発現され、標的分子に選択的に結合することができる抗体またはその抗原結合部分を指す。細胞内抗体を作製するための遺伝子治療の使用に関しては、例えば、1996年3月14日公開のWO96/07321も参照されたい。10

#### 【0401】

イントラボディの細胞内発現は、所望の抗体またはその抗原結合部分をコードする核酸（抗体または抗原結合断片をコードする遺伝子と通常関連している野生型リーダー配列及び分泌シグナルを欠く）を標的細胞に導入することによって達成し得る。本開示の抗体の全てまたは一部をコードする1つ以上の核酸は、細胞内標的ポリペプチドに結合して標的ポリペプチドの活性を調節することができる1つ以上のイントラボディが発現されるよう、標的細胞に送達することができる。核酸を細胞に導入する任意の標準的な方法を使用することができ、これには、限定されないが、マイクロインジェクション、パリスティックインジェクション、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、リポソーム、ならびに関心の核酸を担持するレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、及びワクシニアベクターを用いるトランスフェクションが含まれる。20

#### 【0402】

ある特定の実施形態では、核酸（任意にベクターに含まれる）は、インビポ及びエクスピボの方法によって患者の細胞に導入し得る。インビポ送達の一例では、核酸を、患者に直接、例えば、治療的介入が必要とされる部位に注射する。インビポ送達のさらなる例では、核酸を、ウイルスベクター（例えば、アデノウイルス、単純ヘルペスⅠウイルス、またはアデノ随伴ウイルス）ならびに脂質に基づく系（遺伝子の脂質媒介性移入に有用な脂質は、例えば、DOTMA、DOPE、及びDC-Cholである）によるトランスフェクションを使用して細胞に導入する。特定の遺伝子マーキング及び遺伝子治療プロトコルの総説については、Anderson et al., Science 256:808-813 (1992)、ならびにWO93/25673及びその中に引用されている参考文献を参照されたい。エクスピボ治療の一例では、患者の細胞を取り出し、核酸をこれらの単離された細胞に導入し、修飾された細胞を、直接的に、または例えば、患者に埋め込まれる多孔性膜の中に封入して、患者に投与する（例えば、米国特許第4,892,538号及び第5,283,187号を参照されたい）。核酸のエクスピボ送達に一般的に使用されるベクターは、レトロウイルスベクターである。30

#### 【0403】

別の実施形態では、内在化抗体が提供される。抗体は、細胞内への抗体の送達を増強するある特定の特徴を保有することができるか、またはそのような特徴を保有するように修飾することができる。これを達成するための技術は、当技術分野で既知である。例えば、抗体の陽イオン化は、細胞内へのその取り込みを容易にすることが知られている（例えば、米国特許第6,703,019号を参照されたい）。リポフェクションまたはリポソームを使用して、抗体を細胞内に送達することもできる。抗体断片を使用する場合、標的タンパク質に特異的に結合する最も小さい阻害性断片が有利である場合がある。例えば、抗体の可変領域配列に基づいて、標的タンパク質配列に結合する能力を保持するペプチド分子を設計することができる。そのようなペプチドは、化学的に合成され、かつ／または組換えDNA技術によって產生されることができる。例えば、Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90:7889-7893 (1993)。40

93)を参照されたい。

【0404】

標的細胞内への抗体の進入は、当技術分野で既知の他の方法によって増強することができる。例えば、ある特定の配列、例えば、H I V T a t またはアンテナペディアホメオドメインタンパク質に由来する配列は、細胞膜を横断する異種タンパク質の効率的な取り込みを導くことができる。例えば、Chen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A (1999), 96: 4325 - 4329を参照されたい。

【0405】

抗体の結合標的が脳内に位置する場合、本開示の特定の実施形態は、血液脳関門を横断する抗体を提供する。血液脳関門を横断して分子を輸送するための、いくつかの当技術分野で既知の手法が存在し、これには、限定されないが、物理的方法、脂質に基づく方法、幹細胞に基づく方法、ならびに受容体及びチャネルに基づく方法が含まれる。

【0406】

血液脳関門を横断して抗体を輸送する物理的方法には、限定されないが、血液脳関門を完全に迂回するもの、または血液脳関門に開口を形成することによるものが含まれる。迂回法には、限定されないが、脳内への直接注射（例えば、Papanastassiou et al., Gene Therapy 9: 398 - 406 (2002)を参照）、組織内注入 / 対流増強送達（例えば、Bobo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A (2003)を参照）、ならびに脳内への送達装置の埋込み（例えば、Gill et al., Nature Med. 9: 589 - 595 (2003)、及びGlia del Wafers（商標）、Guildford Pharmaceuticalを参照）が含まれる。関門に開口を形成する方法には、限定されないが、超音波（例えば、米国特許公開第2002/0038086号を参照）、浸透圧（例えば、高張マンニトルの投与によるもの（Neuwelt, E. A., Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation, Vols 1 & 2, Plenum Press, N. Y. (1989)）、例えば、プラジキニンまたは透過処理剤A-7による透過処理（例えば、米国特許第5,112,596号、第5,268,164号、第5,506,206号、及び第5,686,416号を参照）、ならびに抗体をコードする遺伝子を含むベクターを用いる、血液脳関門をまたぐニューロンのransfer（例えば、米国特許公開第2003/0083299号を参照）が含まれる。

【0407】

血液脳関門を横断して抗体を輸送する脂質に基づく方法には、限定されないが、抗体を、血液脳関門の血管内皮上の受容体に結合する抗体結合断片と結合されているリポソーム中に封入すること（例えば、米国特許出願公開第20020025313を参照）、及び抗体を低密度リポタンパク質粒子（例えば、米国特許出願公開第20040204354号を参照）またはアポリポタンパク質E（例えば、米国特許出願公開第20040131692号を参照）中にコーティングすることが含まれる。

【0408】

血液脳関門を横断して抗体を輸送する幹細胞に基づく方法は、関心の抗体を発現するように神経前駆細胞（N P C）を遺伝子操作し、その後、治療されるべき個体の脳に幹細胞を移植することを必要とする。Behrstock et al. (2005) Gene Ther. 2005年12月15日、先行オンライン出版（齧歯類及び靈長類モデルの脳に移植したとき、神経栄養因子G D N Fを発現するように遺伝子操作されたN P Cがパーキンソン病の症状を軽減したことを報告している）を参照されたい。

【0409】

血液脳関門を横断して抗体を輸送する受容体及びチャネルに基づく方法には、限定されないが、糖質コルチコイド遮断薬を使用して血液脳関門の透過性を増加させること（例えば、米国特許出願公開第2002/0065259号、第2003/0162695号、

10

20

30

40

50

及び第 2 0 0 5 / 0 1 2 4 5 3 3 号を参照) ; カリウムチャネルを活性化させること(例えば、米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 0 8 9 4 7 3 号を参照)、A B C 薬物輸送体を阻害すること(例えば、米国特許出願公開第 2 0 0 3 / 0 0 7 3 7 1 3 号を参照) ; 抗体にトランスフェリンをコーティングし、1つ以上のトランスフェリン受容体の活性を調節すること(例えば、米国特許出願公開第 2 0 0 3 / 0 1 2 9 1 8 6 号を参照)、ならびに抗体を陽イオン化すること(例えば、米国特許第 5, 0 0 4, 6 9 7 号を参照)が含まれる。

#### 【 0 4 1 0 】

本開示の抗体は、医療実施基準( *g o o d m e d i c a l p r a c t i c e* )と一致した様式で製剤化、投薬、及び投与される。これに関連して考慮される因子には、治療される具体的な障害、治療される具体的な哺乳動物、個々の患者の臨床状態、障害の原因、薬剤の送達部位、投与の方法、投与のスケジュール、及び医療従事者に既知の他の因子が含まれる。抗体は、必ずしもその必要はないが、場合により、問題になっている障害を予防または治療するために現在使用されている1つ以上の薬剤とともに製剤化される。そのような他の薬剤の有効量は、製剤中に存在する抗体の量、障害または治療の種類、及び上で考察された他の因子によって決まる。これらは、通常、本明細書に記載のものと同じ投薬量及び投与経路で、もしくは本明細書に記載の投薬量の約 1 ~ 9 9 % で、または経験的/臨床的に適切であることが明らかにされている任意の投薬量及び任意の経路で使用される。

#### 【 0 4 1 1 】

疾患の予防または治療のために、本開示の抗体の適切な投薬量( 単独でまたは1つ以上の他の追加の治療剤と組み合わせて使用される場合 )は、治療されるべき疾患の種類、抗体の種類、疾患の重症度及び経過、抗体を予防目的で投与するのか治療目的で投与するのかということ、過去の治療、患者の臨床歴及び抗体に対する応答、ならびに担当医の裁量によって決まる。抗体は、一度にまたは一連の治療の間、患者に好適に投与される。疾患の種類及び重症度に応じて、約 1  $\mu$  g / k g ~ 1 5 m g / k g ( 例えば、0. 1 m g / k g ~ 1 0 m g / k g ) の抗体が、例えば、1回以上の別々の投与によるものであれ、連続注入によるものであれ、患者への投与のための初期候補投薬量であることができる。1つの典型的な1日投薬量は、上述の因子に応じて、約 1  $\mu$  g / k g ~ 1 0 0 m g / k g 以上の範囲であり得る。数日間またはそれより長くにわたる繰り返し投与については、状態に応じて、通常、疾患症状の所望の抑制が起こるまで治療を持続させる。抗体の1つの例示的な投薬量は、約 0. 0 5 m g / k g ~ 約 1 0 m g / k g の範囲である。したがって、約 0. 5 m g / k g 、2. 0 m g / k g 、4. 0 m g / k g 、もしくは 1 0 m g / k g のうちの1つ以上の用量( またはその任意の組み合せ )を患者に投与することができる。そのような用量は、間欠的に、例えば、週に1回または3週に1回( 例えば、患者が約 2 ~ 約 2 0 用量、または例えば、約 6 用量の抗体を受容するように )投与することができる。初期のより高い負荷用量と、それに次ぐ、1つ以上のより低い用量を投与することができる。例示的な投与レジメンは、約 4 m g / k g の初期負荷用量と、それに次ぐ、週に1回の約 2 m g / k g の抗体の維持量を投与することを含む。しかしながら、他の投薬量レジメンが有用である場合がある。この治療の進行は、従来の技術及びアッセイによって容易にモニタリングされる。

#### 【 0 4 1 2 】

上記の治療方法はいずれも、抗突然変異体 S M O 抗体の代わりにまたはそれに加えて本発明の免疫コンジュゲートを使用して実施し得ることが理解されよう。

#### 【 0 4 1 3 】

##### V I I . 医薬製剤

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のヘッジホッグ経路阻害剤または本開示に従うヘッジホッグ経路阻害剤のいずれかは、薬学的組成物中で製剤化され得る。

#### 【 0 4 1 4 】

本開示に従って使用されるヘッジホッグ経路阻害剤の薬学的組成物は、所望の純度を有

10

20

30

40

50

する薬剤（複数可）を、凍結乾燥製剤または水溶液の形態で、任意の薬学的に許容される担体、賦形剤、または安定剤（Remington: The Science of Practice of Pharmacy. 20th edition, Gennaro, A. et al., Ed., Philadelphia College of Pharmacy and Science (2000)）と混合することによって保管のために調製し得る。許容される担体、賦形剤、または安定剤は、用いられる用量及び濃度でレシピエントに無毒であり、酢酸塩、トリス、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸などの緩衝液；アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化剤；保存剤（例えば、オクタデシルジメチルベンジル（octadecyl dimethylbenzyl）塩化アンモニウム；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルアルコールまたはベンジルアルコール；メチルパラベンまたはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン；カチコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペニタノール；及びm-クレゾール）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルビロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、またはリジンなどのアミノ酸；单糖類、二糖類、及び他の糖質（グルコース、マンノース、またはデキストリンを含む）；EDTAなどのキレート剤；トレハロース及び塩化ナトリウムなどの等張化剤（tonicifier）；ショ糖、マンニトール、トレハロース、またはソルビトールなどの糖類；ポリソルベートなどの界面活性剤；ナトリウムなどの塩生成対イオン；金属錯体（例えば、亜鉛-タンパク質錯体）；及び/またはTWEEN（登録商標）、PLURONICS（登録商標）、またはポリエチレングリコール（PEG）などの非イオン性界面活性剤を含む。

10

20

30

40

50

#### 【0415】

いくつかの実施形態では、本開示に従う、及び/または本明細書に記載のヘッジホッグ経路阻害剤の製剤のいずれも、治療される特定の症状に必要な、1つ超の活性化合物、いくつかの実施形態では、互いに悪影響を及ぼさない、相補的活性を有する化合物を含み得る。ある特定の実施形態では、ヘッジホッグ経路阻害剤及び第2の活性剤は、ともに製剤化される（例えば、両方の薬剤を含む製剤または組成物）ことが認識されるべきである。他の実施形態では、2つ（またはそれ以上）の活性剤を別々に製剤化して、その結果、別々の製剤を、一緒にまたは別々に、マーケティング、販売、保管、及び使用することができるようとする。別々に製剤化する場合、本開示は、それらを同じ時間または異なる時間に投与することができ、ある特定の実施形態では、組み合わせて同時投与し得ることを企図する。

#### 【0416】

例えば、前述の治療薬（複数可）に加えて、さらなる抗体、例えば、第2のそのような治療薬、または他の何らかの標的（例えば、腫瘍の成長に影響する成長因子）に対する抗体を製剤に含めることができが望ましい場合がある。いくつかの実施形態では、ヘッジホッグ阻害剤（例えば、ロボトキニン（robotkinin））を製剤に含めることができが望ましいことがある。あるいは、またはさらに、組成物は、化学療法剤、細胞毒性剤、サイトカイン、成長阻害薬剤、抗ホルモン剤、及び/または心臓保護剤をさらに含んでもよい。そのような分子は、意図する目的に有効な量で組み合わせて好適に存在する。いくつかの実施形態では、さらなる活性化合物はステロイド系アルカロイドである。いくつかの実施形態では、ステロイド系アルカロイドは、シクロパミン、またはKAAD-シクロパミンもしくはジエルビンもしくはその任意の機能的誘導体（例えば、IPI-269609またはIPI-926）である。いくつかの実施形態では、さらなる活性化合物は、ビスマデギブ、ソニデギブ、BMS-833923、PF-04449913、もしくはLY2940680、またはそれらの任意の誘導体である。いくつかの実施形態では、さらなる活性化合物は、Amakye, et al., Nature Medicine, 19 (11): 1410-1422（その全体が本明細書に組み込まれる）に開示されている化合物のうちのいずれかである。いくつかの実施形態では、さらなる活性化合物は、ベラトラム

アルカロイドまたはビスマデギブに化学的に関係していない別のスムースンド阻害剤であり、これには、限定されないが、エリベッジ、BMS-833923(XL319)、LDE225(エリスマデギブ(Erismodegib))、PF-04449913、NVP-LDE225、NVP-LEQ506、TAK-441、XL-319、LY-2940680、SEN450、イトラコナゾール、MRT-10、MRT-83、またはPF-04449913が含まれる。上述のように、本開示は、第2の活性剤がヘッジホッグ経路阻害剤と一緒に(例えば、2つの活性剤を含む単一の製剤として)製剤化される製剤、及び2つの活性剤が2つの別々の製剤または組成物中に存在する実施形態を企図している。

## 【0417】

10

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のものなどの本開示のヘッジホッグ経路阻害剤のうちのいずれかはまた、例えば、コアセルベーション技法によってか、または界面重合によって調製されたマイクロカプセル、例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースマイクロカプセルまたはゼラチンマイクロカプセル及びポリ-(メチルメタシレート(methyl methacrylate))マイクロカプセルに、コロイド状の薬物送達系(例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、及びナノカプセル)に、またはマクロエマルジョンに、封入してもよい。そのような技法は、前出のRemington: The Science and Practice of Pharmacyに開示されている。

## 【0418】

20

いくつかの実施形態では、本開示のヘッジホッグ経路阻害剤のいずれかは、持続放出調製物中に製剤化される。持続放出調製物の好適な例には、本抗体を含む固体の疎水性ポリマーの半透性マトリクスが含まれ、このマトリクスは、成形品、例えば、フィルムまたはマイクロカプセルの形態で存在する。持続放出マトリクスの例には、ポリエステル、ヒドロゲル(例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)、またはポリ(ビニルアルコール))、ポリラクチド(米国特許第3,773,919号)、L-グルタミン酸とエチル-L-グルタメートとのコポリマー、非分解性エチレン酢酸ビニル、分解性の乳酸-グリコール酸コポリマー(例えば、LUPRON DEPOT(登録商標)(乳酸-グリコール酸コポリマー及び酢酸ロイプロリドで構成される注射可能なミクロスフェア)、ならびにポリ-D-(-)-3-ヒドロキシ酪酸が含まれる。

## 【0419】

30

本開示の方法における使用のための本開示の組成物の量は、標準的な臨床技法によって決定することができ、特定の症状または使用に応じて変化し得る。有効用量は、インビトロまたは動物モデル試験系から導いた用量反応曲線から外挿し得る。

## 【0420】

40

ある特定の実施形態では、薬学的調製物を含む本開示の組成物は、非発熱性である。換言すると、ある特定の実施形態では、本組成物は、実質的に発熱物質を含まない。一実施形態では、本開示の製剤は、内毒素及び/または関連する発熱性物質を実質的に含まない発熱物質不使用製剤である。内毒素には、微生物内部に閉じ込められ、その微生物が分解または死亡するときにのみ放出される毒素が含まれる。発熱性物質には、細菌及び他の微生物の外膜由来の熱誘導性熱安定性物質(糖タンパク質)も含まれる。これらの物質の両方は、ヒトへの投与時に、熱、低血圧、及びショックを引き起こし得る。可能性のある悪影響に起因して、内毒素は、少量であっても、静脈内投与される製薬溶液から除去しなければならない。Food & Drug Administration(「FDA」)は、静脈内薬物適用のための単一の1時間の期間で体重1キログラム当たりの用量当たり5内毒素単位(EU)という上限を設定している(The United States Pharmacopeial Convention, Pharmacopeial Forum 26(1):223(2000))。治療用タンパク質を、比較的大きな用量及び/または長い期間にわたって(例えば、患者の一生涯の間など)投与する場合、有害で危険な内毒素は少量であっても危険となり得る。ある特定の実施形態では、組成物中の

50

内毒素及び発熱物質レベルは、10 EU / mg 未満、または5 EU / mg 未満、または1 EU / mg 未満、または0.1 EU / mg 未満、または0.01 EU / mg 未満、または0.001 EU / mg 未満である。

#### 【0421】

いくつかの実施形態では、本ヘッジホッグ経路阻害剤は、滅菌製剤において製剤化される。これは、滅菌濾過膜を通した濾過によって容易に達成される。

#### 【0422】

##### I X . 製造品及びキット

いくつかの実施形態では、本明細書に開示のヘッジホッグ経路阻害剤などの本開示のヘッジホッグ経路阻害剤は、製造品において調製される。同様に、突然変異体SMOポリペプチドなどの本開示のポリペプチド及び核酸は、製造品として調製されてもよい。いくつかの実施形態では、製造品は、容器と、ヘッジホッグシグナル伝達の全体的または部分的な阻害のため、あるいはヘッジホッグシグナル伝達経路の活性化に起因する障害または状態の治療のための使用を示す、容器上のまたは容器に関連するラベルまたは添付文書とを含む。他の実施形態では、製造品は、容器と、スクリーニングアッセイにおける使用を示す、容器上のまたは容器に関連するラベルまたは添付文書とを含む。好適な容器には、例えば、ボトル、バイアル、注射器などが含まれる。容器は、ガラスまたはプラスチックなどの様々な材料から形成され得る。いくつかの実施形態では、容器は、癌症状を治療するのに有効な組成物を保持し、滅菌アクセスポートを有してもよい（例えば、容器は、皮下注射針によって貫通可能なストッパーを有する静脈注射用溶液袋またはバイアルであってもよい。組成物中の少なくとも1つの活性剤はヘッジホッグ経路阻害剤である。ラベルまたは添付文書は、ヘッジホッグ経路阻害剤を投与するため、またはSMOポリペプチドもしくは核酸もしくはベクターもしくは宿主細胞を使用するための指示をさらに含むことになる。さらに、製造品は、注射用静菌水（BWF I）、リン酸緩衝生理食塩水、リングル液、及びブドウ糖液などの薬学的に許容される緩衝液を含む第2の容器をさらに含んでもよい。製造品は、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、及び注射器を含む、商業的な観点及びユーザーの観点から望ましい他の物質をさらに含んでもよい。

10

20

30

40

#### 【0423】

いくつかの実施形態では、様々な他の目的、例えば、突然変異体SMOタンパク質発現細胞殺滅アッセイ、ヘッジホッグシグナル伝達ポリペプチドの細胞からの精製または免疫沈降に有用なキットが提供される。突然変異体SMOタンパク質の単離及び精製のため、キットは、ビーズ（例えば、セファロースビーズ）と結合させた各突然変異体SMOタンパク質結合試薬を含むことができる。例えばELISAまたはウェスタンプロットにおける、インピトロでの突然変異体SMOタンパク質の検出及び定量化のために、そのような分子を含むキットが提供され得る。いくつかの実施形態では、本製造品のように、キットは、容器と、容器上のまたは容器に関連するラベルまたは添付文書とを含む。いくつかの実施形態では、容器は、本開示とともに使用可能な少なくとも1つのそのようなヘッジホッグ経路阻害剤試薬を含む組成物を保持する。いくつかの実施形態では、例えば、希釈剤及び緩衝液、対照抗体を含むさらなる容器を含めてもよい。いくつかの実施形態では、ラベルまたは添付文書は、組成物の説明、及び意図されるインピトロまたは診断的使用のための指示を提供し得る。

#### 【実施例】

#### 【0424】

本開示をここまでで概して説明してきたが、本開示は、以下の実施例を参照することによってより容易に理解されることになり、これらの実施例は、単に本開示のある特定の態様及び実施形態を例示する目的で含めたのであって、本開示を限定することは意図していない。

#### 【0425】

実施例1：ビスマデギブ耐性基底細胞癌の遺伝子分析

標的療法（例えば、癌療法）に対する臨床応答は、薬物耐性を付与する遺伝子変化の獲

50

得に起因して短命に終わり得る。耐性機構の同定は、新規の治療戦略の指針となるであろう。不適切な Hh シグナル伝達は、基底細胞癌 (BCC) を含むいくつかの癌と結び付けられる。PTCH における機能喪失突然変異 (約 90%) 及び SMO における活性化突然変異 (約 10%) が、BCC における主要な駆動因子である。ビスマデギブ (GDC-0449) への耐性の臨床機構を、再発した基底細胞癌のエクソーム、RNA、及びコピー数分析を使用して同定した。

#### 【0426】

図 2 に示すように、ビスマデギブ耐性は、ビスマデギブ耐性 BCC を患う患者における上昇したヘッジホッグ経路シグナル伝達と関連した。ビスマデギブ耐性 BCC のエクソームシーケンシング及びコピー数分析の結果を以下で表 3 に示す。

10

#### 【表 6】

表 3

患者	発癌駆動因子	可能性のある耐性機構
MG	PTCH1, spc1504 (生殖系列)	SMO, W535L
JT	SMO, W535L (体細胞)	不明
KL	PTCH1, P1387S, PTCH1, Q853*	不明
*PT20764	PTCH1, F81017 (フレームシフト (生殖系列) 及び LOH)	SMO, W281C (G>T)
*PT20741	PTCH1, A1380V	SUFU, F824I
*PT20849	PTCH1, S616G (スプライシング及び LOH)	He-t, SUFU欠失、He-t, PTEN欠失
*PT20840	PTCH1, Q501H (スプライシング及び LOH)	SMO, A459V (C>T)
*PT20842	PTCH1, F8108 (フレームシフト及び LOH)	SMO, A459V (C>T)

20

30

#### 【0427】

遺伝子型決定により、さらなるビスマデギブ耐性腫瘍における SMO - A459V 突然変異の第 3 の事例が明らかとなった。SMO - A459V は、分析した 9 人の耐性患者のうち 3 人で治療後の生検において見出された再発性突然変異である。SMO - A459V 突然変異は、治療後にのみ存在し、42 個の独立した未治療 BCC 試料には存在しなかった。(図 3 参照)。SMO - A459V 突然変異は、SMO を活性化することができる。

#### 【0428】

SMO - W281C 突然変異も再発性 BCC において検出された。図 4 に示すように、SMO - W281C は、ビスマデギブ結合ポケット中にある。

40

#### 【0429】

WT - SMO、SMO - W281C、SMO - A459V、PTCH、または空ベクター (EV) を、C3H10T1/2 細胞中で GLI1 ルシフェラーゼレポーターでコントラスフェクトした。SMO - A459V が、PTCH1 及びビスマデギブに対する感受性が減少した活性化突然変異であることが示された。(図 5A ~ 5C。エラーバーは標準偏差を表す。) SMO - W281C は、SMO - WT と同じだけ PTCH 阻害に感受性である。(図 5D ~ 5E。エラーバーは標準偏差を表す。) 示すコンストラクトでコントラスフェクトした 293 細胞を、50 μM の冷ビスマデギブを用いてまたは用いずに、5 nM の [<sup>3</sup>H] - ビスマデギブとともにインキュベートした。特異的結合 = 全体 - 非特異的結合

50

。 (図5E。エラーバーは標準偏差を表す。)

【0430】

臨床SMO突然変異のサブグループは2つあるように見える。1)薬物感受性が低減した活性化サブグループ(A459V及びW535Lを含む)、ならびに2)Ptc h感受性を維持するが、ビスマデギブ結合ポケットの立体構造を分断する突然変異サブグループ(D473H及びW281Cを含む)。

【0431】

実施例2：ビスマデギブ耐性及び非治療BCCのゲノム分析

ビスマデギブ耐性と関連する突然変異を特定するために、全エクソームシーケンシング(WES)を、ゴーリン症候群( $n=5$ )及び孤発性( $n=6$ )患者由来のBCCに行い、標的化SMOシーケンシングを、さらなるゴーリン患者由来のホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)試料に行った。すべての患者は、最初はビスマデギブの臨床的利益を経験したが、その後治療を受けている間に進行した。

【0432】

ビスマデギブ耐性BCC由来の合計16個の生検が分析されるように、患者のうちの4人から2つの明白に異なる生検を収集した。患者は、転移性(図6B)または局所進行性BCC(図6C)と診断され、薬物耐性病変がBCCであったことが組織学的に確認された(図6D)。比較のために、非治療ゴーリン症候群( $n=16$ )及び孤発性( $n=27$ )BCC患者由来の腫瘍をWESに供した。2つの明白に異なる生検をゴーリン患者のうちの5人から得て、これにより合計48個の非治療BCC生検を得た。ゴーリン患者由来の非治療BCC試料の平均体細胞突然変異は、33.5/Mbであり、6.2~68.9/Mbで変動し、孤発性患者については、50.5/Mbであり、2.4~162.2/Mbの範囲であった。これらの率は、黒色腫を含む他の癌と比較して高く(Lawrenceら、2013)。体細胞突然変異スペクトルの大域分析により、両方のコホートにおいてシトシンからチミンへの(C>T)移行突然変異の優位性が明らかになり、これは、紫外線光誘導性突然変異生成を示す(Miller、1985)。

【0433】

RNA-seqを使用する再発性BCC生検( $n=11$ )の転写分析により、Hh標的遺伝子GLI1が、正常皮膚試料のコレクションよりも10倍高く(DESeq2,  $p < 0.003$ )発現されたことが分かった(図6E)。さらに、GLI1発現レベルは、増殖マーカーMKI67の発現レベルと高度に相関し( $R=0.96$ )、これは、BCC再成長を駆動するHhシグナル伝達の再活性化と一致した。したがって、分析は、Hhシグナル伝達を再活性化してビスマデギブによるSMO阻害をバイパスする遺伝子機構を同定することに集中した。この目的で、選択された癌遺伝子における突然変異(Kandot hら、2013)及び正準Hh経路成分を同定した。次に、ビスマデギブ耐性BCCにおける全ゲノムコピー数変化及びLOHを、一塩基多型(SNP,  $n=11$ )及び比較ゲノムハイブリダイゼーション(CGH,  $n=4$ )アレイを使用して決定した。

【0434】

実施例3：BCC開始におけるPTCH1及びSMO突然変異

BCC遺伝学についてこれまでの報告(Jayaramanら、2014; Reif enbergerら、2005)と一致して、再発性ゴーリン(100%)の全て及び孤発性(75%)BCCの大部分が腫瘍サプレッサーPTCH1における突然変異を示し、これは、遺伝子の長さ全体にわたって生じ、恐らく有害である。7つは短縮型であり、4つはエクソンスプライシングに影響する可能性が高く、2つはCondéアルゴリズム(Gonzalez-Perez及びLopez-Bigas、2011)によって有害であると予測される。ゴーリン患者BCC(PT12)も、PTCH1における変化によって開始した可能性が高かった。PTCH1変化を持たない再発性孤発性腫瘍( $n=2$ )は、既知の発癌性突然変異SMO-W535Lを有した(Xieら、1998)。これらのPTCH1及びSMO変異体は、最初に応答し、続いてビスマデギブ耐性を示したBCCにおける開始事象である可能性が高い。

10

20

30

40

50

## 【0435】

PTCH1変異体の頻度についての同様の傾向が非治療ゴーリン(90%)及び孤発性(78%)BCCにおいて観察され、同定された既知の発癌性SMO突然変異が3つの弧発例において観察された(図7)。再発性BCCがゴーリン(50%)症例と孤発性(57%)症例との間で同様のTP53変異体頻度を示した一方で、非治療コホートでは、TP53変異体はゴーリンBCC(24%)よりも孤発性BCC(59%)において頻繁に観察され、これは、非治療孤発性BCCにおいて観察されたより高い突然変異率を反映し得る。

## 【0436】

実施例4：SMO変異体のビスモデギブ依存性選択

10

驚くべきことに、再発性腫瘍生検の大部分は、薬物標的SMOに突然変異を有し(11/16、69%)、ほとんどがPTCH1変異体と共に生じた。これに対し、SMO変異体は、非治療ゴーリンBCCには完全に不在であり、4/27(15%)の非治療孤発性BCCにのみ存在した。再発性BCCにおいて同定されたSMO突然変異を図8Aに要約する。SMO-L412F、SMO-W535L、及びSMO-S533N突然変異は、発癌駆動因子としてこれまでに報告されており(Reifenbergerら、1998; Sweeneyら、2014; Xieら、1998)、一方でSMO-W281C及びSMO-V321Mは、ビスモデギブ耐性BCCにおいて最近同定された(Brinkhuijsenら、2014)。非治療BCCコホート、またはHh駆動型癌のこれまでの遺伝子分析(Brastianosら、2013; Clarkら、2013; Jayaramanら、2014; Koolら、2014; Reifenbergerら、1998)において観察されなかった、SMO-T241M、SMO-I408V、SMO-A459V、及びSMO-C469Yを含む4つのSMO突然変異が発見され、これは、それらのビスモデギブ耐性への関与を強く示す。この研究からの全てのSMO突然変異は、TM領域内に位置し(図8B及び9A)、いくつかの種に由来するSMOタンパク質の間で高度に保存される残基におけるアミノ酸置換を付与し、これは、SMO機能におけるそれらの重要性を反映している可能性が高い。

20

## 【0437】

耐性機構は、デノボで、またはより可能性が高いものとしては治療前腫瘍に存在するマイナーサブクローニングの選択によって、獲得され得る。両シナリオにおいて、治療による薬物耐性に関与する変化の強化が観察され得ることが予期された。SMO突然変異体の薬物依存性選択を評価するために、治療前腫瘍における突然変異の検出及び治療後のSMO突然変異を有する腫瘍細胞の割合を検査した。この目的で、6人の患者から入手可能であった治療前FFPE腫瘍試料をシーケンシングし、治療後腫瘍クローニングについて分析した。SMO-A459Vを3人の患者からの治療後生検において検出したが、対応する治療前生検におけるバックグラウンドレベルを超えて検出可能ではなかった(図8C)。同様に、SMO-V321M、SMO-T241M、及びSMO-C469Yに対応するヌクレオチド変化は、治療後試料においてのみバックグラウンドレベルを超えて検出可能であり、このことは、デノボで生じたか、または本アッセイの検出限界を下回るレベルで最初に存在した、SMO突然変異体細胞の薬物誘導性選択と一致していた(図8D及び8E)。興味深いことに、これまでに報告されたSMO-L412F突然変異は、患者PT11由来の治療前試料と治療後試料との両方において容易に検出され、これは、この変異体がこの腫瘍に対する発癌駆動因子である可能性が高いことを示唆した(図8F)。突然変異体ヌクレオチドの頻度は治療の際に減少するように見えることに留意されたく、これは治療後試料におけるより高いレベルの正常組織の汚染に起因する。コピー数及びSNPアレイ分析により、この腫瘍が、最初はPTCH1についての2倍体であり、治療後にPTCH1コピー数喪失を獲得したことが明らかになった。理論に束縛されるものではないが、この患者が最初はビスモデギブに応答した(図8H)という事実は、低減したPTCH1レベル(コピー喪失によって)が、この発癌性突然変異の文脈では、投薬中に腫瘍の再成長を促進し得る可能性を提起する。

30

40

50

## 【0438】

S MO 突然変異が再発性 BCCにおいて優勢なクローン中に存在したかどうかに取り組むために、PTCH1及びS MO変異体の腫瘍細胞画分を、WESからの対立遺伝子頻度、ならびにSNPアレイからのコピー数及び腫瘍容量情報を使用して計算した (Greenmanら、2010; Nik-Zainalら、2012; Stjernqvistら、2011)。ヘテロ接合生殖系列PTCH1突然変異は、ゴーリン患者由来の生検における正常な皮膚の汚染、及び観察される場合には腫瘍細胞における後続のLOHの原因であった。PT09を除き、S MOは再発性BCCにおいて2倍体であったため、完全クローン性ヘテロ接合性S MO変異体の予期された対立遺伝子頻度は、腫瘍内容物の50%であり、これを次に、観察されたアレル頻度と比較した。PTCH1突然変異は、腫瘍細胞の80%超で存在し、このことは、これらの腫瘍における発癌駆動因子であるPTCH1における有害事象と一致していた。正常汚染及び観察された対立遺伝子頻度に基づくと、全てのS MO突然変異が、これらのビスマデギブ耐性BCCにおいて腫瘍細胞の60%超で存在することが予期され、このことは、薬物治療の際のそれらの選択と一致していた。

10

## 【0439】

実施例5：S MOの薬物結合ポケットにおける突然変異はビスマデギブに対する耐性を付与する

本研究で発見したS MO突然変異の特性を洞察するために、最近解明されたS MO-TM領域の結晶構造を利用した (Wangら、2013)。ビスマデギブのS MO構造への計算ドッキングにより、S MO-W281、S MO-V321、S MO-I408、及びS MO-C469が薬物結合ポケットの近位に位置することが明らかになった (DBP、図10A)。S MO-W281の芳香族インドールは、ビスマデギブのピリジン環との辺対面 (edge-to-face) パイスタッキング相互作用を形成し、S MO-W281C突然変異体のそれほど嵩高でない硫黄への置換によって分断される狭い疎水性のポケットを形成するのを助ける (図10B、真ん中のパネル)。さらに、バリン321からメチオニンへの突然変異は、W281の位置決定に干渉する可能性が高く、薬物結合に二次的影響を与える (図10B、右のパネル)。W281とは異なり、残基I408は、試験した計算モデルにおいて薬物と直接的に接触せず、代わりにこれは、喪失時に、これらの残基の立体構造を変化させることによって結合に影響することが予期されるそのデルタメチル基との結合ポケット残基H470及びV404に対してパックする (図10C)。C469の嵩高のチロシンへの置換は、結合ポケットに対する立体効果を励起してその立体構造を分断し得ることが予期された。

20

30

40

## 【0440】

DBPにおける突然変異の機能的影響を試験するために、Gli-ルシフェラーゼ系Hhレポーターアッセイを使用した。DBP突然変異は、ビスマデギブのIC50を、80nMのIC50を有したS MO-WTのものよりも12~49倍増加させた (図12A)。これらのIC50値は本アッセイにおけるS MOの過剰発現に起因する過大評価であることに留意するべきである (Dijkgraafら、2011)。各DBP突然変異は、S MO-WTと比較して基礎活性のわずかな (1.5倍未満) 増加を示したが (図11A)、S MO-I408V以外の全てがPTCH1過剰発現によって容易に阻害された (図11B)。次に [3H]標識化ビスマデギブのS MO-I408V及びS MO-W281Cへの結合を試験すると、それぞれ、IC50の最小及び最大の増加を呈した (図12A)。両方の突然変異がS MO-WTと同様に細胞表面レベルで発現されたが、ビスマデギブ結合障害を示した (図12B及び11C)。

50

## 【0441】

腫瘍退縮を誘導するためには、Hh経路が転写レベルで90%超阻害される必要があることが、臨床前腫瘍モデルにおいて示されている (Wongら、2011)。これらのS MO突然変異がビスマデギブの存在下で細胞増殖に与える影響をよりよく理解するために、小脳顆粒ニューロン前駆体 (CGNP) 細胞のウイルス形質導入についてのアッセイを開発した。Hh駆動型腫瘍細胞が培養中にそのHh経路依存性を急速に喪失することが、

50

これまでに述べられている (Sasakiら、2006)。しかしながら、CGNPは、Hh依存性の様式で、インビオで増殖し、一定期間、培養中でそのHh経路依存性を維持する (Wechsler-Reya及びScott、1999)。Ptcch110xp/10xp Tp5310xp/10xp Rosa26LSL-tdTomato (PPT) パップから単離したCGNPを、高感度緑色蛍光タンパク質 (eGFP) - Cre融合タンパク質とともに、SMO変異体を発現しているレンチウイルスコンストラクトに感染させた (図12C)。Creリコンビナーゼは、Ptcch1の喪失を誘導し、それにより形質導入されたCGNPのみが外因性ソニックヘッジホッグリガンド (SHH、図11D) の非存在下で増殖し得ることを保証する。これにより、SHHリガンドを除去した後で、様々なSMO突然変異体がビスマデギブ及び他の阻害剤の存在下で増殖を促進する能力を試験することが可能となった。メチル-[3H]-チミジン組み込みによる増殖を監視した一方、Cre依存性タンデム二量体 (td) Tomato発現により、感染した細胞の可視化及び定量化が可能になった。SMO突然変異のほとんどが、TP53突然変異を有し、PTCH1の喪失によって駆動された腫瘍において同定されたため、このシステムにより、より良好なモデル患者遺伝学も可能となった。SMO-WT及びCreに感染させたPPT CGNPは、約22nMのIC50を有し、増殖は、100nMのビスマデギブで最大限に阻害された。対照的に、全てのDBP突然変異がビスマデギブ感受性に対して劇的な効果を有し、感染した細胞は高レベルのビスマデギブ (1μM超、図12D) で増殖を続けた。驚くべきことに、SMO-W281CまたはSMO-C469Yのいずれかに感染させた細胞は、5μMのビスマデギブの存在下であっても非治療に近いレベルで増殖を続け、これは、これらの残基の薬物結合における直接的な役割を反映している可能性が高い。Cre依存性tdTomatoレポーター発現に対する蛍光活性化細胞分類 (FACS) 分析によって、CGNPが同様の頻度で感染したこと、及び定量的逆転写 (qRT) PCRによって、SMO変異体が等レベルで発現されたことを確認した。

#### 【0442】

#### 実施例6：SMO薬物結合ポケットの突然変異によるビスマデギブへの耐性の予測

他のDBP突然変異が薬物耐性を促進し得るかどうかを調査するために、計算モデルを使用して、原子がビスマデギブの4.5以内に位置する21個のSMO残基を同定した (図13A)。アルゴリズムを使用して、本研究からのSMO-W281C及びSMO-I408Vを含む、これらのDBP残基に非同義的変化をもたらした160個の異なる单一ヌクレオチド変異体を同定した (表4)。

10

20

30

【表7-1】

表4: ビスマデギブ及びLY2940680両方の4, 5オングストローム以内の原子を有するSMO残基の同定

AA位置	A A	コード ン	非同義的な单一ヌ クレオチドの変化	AA変 化	C/G> T/A変 化	突然変異体注釈
219	N	AA C	TAC, GAC, CAC, ATC, AGC, ACC, AAA, AAG	Y, D, H, I, S, T, K, K	なし	N219Dはビスマ デギブ及びLY2 940680への感 受性を低減させた (本研究、及びBu onamiciら、 2010)
221	L	CT C	ATC, TTC, GTC, CAC, CGC, CCC	I, F, V, H, R, P	F	L221RはLY2 940680への感 受性を低減させた (Buonamici ら、2010)
230	M	AT G	TTG, GTG, CTG, AAG, AGG, ACG, ATA, ATT, ATC	L, V, L, K, R, T, I, I, I	I	
281	W	TG G	AGG, GGG, CGG, TAG, TTG, TCG, TGA, TGT, TGC	R, G, R, *, L, S, , C, C	*	W281C、本研 究、及びBrink huizenら、2 014
325	L	CT G	ATG, GTG, CAG, CGG, CCG	M, V, Q, R, P	なし	

10

20

30

【表7-2】

384	D	GA C	AAC, TAC, CAC, GTC, GGC, GCC, GAA, GAG	N, Y, H, V, G, A, E, E	N	D384Nはビスマデギブ及びLD-E-225への感受性を低減させた (本研究、及びBunamiciら、2010)	10
389	I	AT T	TTT, GTT, CTT, AAT, AGT, ACT, ATG	F, V, L, N, S, T, M	なし		
391	F	TT T	ATT, GTT, CTT, TAT, TGT, TCT, TTA, TTG	I, V, L, Y, C, S, L, L	なし		20
394	Y	TA C	AAC, GAC, CAC, TTC, TGC, TCC, TAA, TAG	N, D, H, F, C, S, *, *	なし		
400	R	CG T	AGT, TGT, GGT, CAT, CTT, CCT	S, C, G, H, L, P	C	R400A、部分的に機能的(Dijkgraafら、2011)	30
408	I	AT C	TTC, GTC, CTC, AAC, AGC, ACC, ATG	F, V, L, N, S, T, M	なし	I408V、本研究	
470	H	CA C	AAC, TAC, GAC, CTC, CGC, CCC, CAA, CAG	N, Y, D, L, R, P, Q, Q	Y	H470A、発現なし(Dijkgraafら、2011)	40
477	Q	CA G	AAG, TAG, GAG, CTG, CGG, CCG, CAT, CAC	K, *, E, L, R, P, H, H	E		

【表7-3】

480	W	TG G	AGG, GGG, CGG, TAG, TTG, TCG, TGA, TGT, TGC	R, G, R, *, L, S, *, C, C	*	W480A、発現なし(Dijkgraafla, 2011)
481	E	GA G	AAG, TAG, CAG, GTG, GGG, GCG, GAT, GAC	K, *, Q, V, G, A, D, D	K	
484	F	TT C	ATC, GTC, CTC, TAC, TGC, TCC, TTA, TTG	I, V, L, Y, C, S, L, L	なし	
515	L	CT T	ATT, TTT, GTT, CAT, CGT, CCT	I, F, V, H, R, P	F	L515A、発現あり、活性化、ビスマデギブによる1mMの障害に感受性(Dijkgraafla, 2011)
518	E	GA G	AAG, TAG, CAG, GTG, GGG, GCG, GAT, GAC	K, *, Q, V, G, A, D, D	K	E518K及びE518Aはビスマデギブへの感受性を低減させた(Dijkgraafla, 2011)
521	N	AA C	TAC, GAC, CAC, ATC, AGC, ACC, AAA, AAG	Y, D, H, I, S, T, K, K	なし	N521A、発現なし(Dijkgraafla, 2011)
522	L	CT G	ATG, GTG, CAG, CGG, CCG	M, V, Q, R, P	なし	

10

20

30

40

【表7-4】

525	M	AT G	TTG, GTG, CTG, AAG, AGG, ACG, ATA, ATT, ATC	L, V, L, K, R, T, I, I, I	I	
241	T	AC G	TCG, GCG, CCG, AAG, ATG, AGG	S, A, P, K, M, R	M	T241M、本研究
321	V	GT G	ATG, TTG, CTG, GAG, GGG, GCG	M, L, L, E, G, A	M	V321M、本研究、及びBrink huizenら、2014
387	S	AG T	TGT, GGT, CGT, AAT, ATT, ACT, AGA, AGG	C, G, R, N, I, T, R, R	N	S387Nはビスマデギブ及びLD E-225への感受性を低減させた (本研究、及びBonamiciら、 2010)
459	A	GC C	ACC, TCC, CCC, GAC, GTC, GGC	T, S, P, D, V, G	V	A459V、本研究
469	C	TG C	AGC, GGC, CGC, TAC, TTC, TCC, TGA, TGG	S, G, R, Y, F, S, *, W	Y	C469Y、本研究
473	D	GA C	AAC, TAC, CAC, GTC, GGC, GCC, GAA, GAG	N, Y, H, V, G, A, E, E	N	D473H (Yau chら、2009)、 Pを除く全てのaa がビスマデギブ への感受性を低減 させる (Dijk graafら、201 1)

【0443】

配列番号1の位置219、221、281、384、408、及び518に対応するアミノ酸は、ビスマデギブ結合ポケットにある。配列番号1の位置241、321、387、459、469、及び473に対応するアミノ酸は、臨床突然変異と関連付けられるが、SMOとの結合時にビスマデギブの4.5オングストローム以内には見出されない。SMO-D473はこの方法では同定されなかったが、SMO結晶構造により、D473が

、R 4 0 0 、H 4 7 0 、E 5 1 8 、及びN 5 2 1 を含むビスモデギブに直接接触するいくつかの残基との水素結合ネットワークを形成することが明らかとなった (W a n g ら、2 0 1 3 ; Y a u c h ら、2 0 0 9 )。S M O E 5 1 8 は、突然変異時にビスモデギブ感受性に影響する残基としてアラニンスキヤン突然変異生成によって既に同定された (D i j k g r a a f ら、2 0 1 1 )。この手法はまた、水素結合ネットワークを通してS M O 立体構造を安定させることができると予測される、N 2 1 9 及びD 3 8 4 を含むS M O 阻害剤ソニデギブ (L D E 2 2 5 )に対する耐性の前臨床モデルに既に関係があるとされた残基 (表4 ; B u o n a m i c i ら、2 0 1 0 )を同定した (図1 3 B )。驚くべきことに、S M O - N 2 1 9 D 、S M O - D 3 8 4 N 、及びS M O - S 3 8 7 N は全て、G 1 i ルシフェラーゼに基づくH h レポーターアッセイにおけるS M O - W T と比較して低減したビスモデギブに対する感受性を示した (図1 3 C )。さらに、S M O 阻害剤L Y 2 9 4 0 6 8 0 及びビスモデギブが1 4 個の接触残基を共有することが見出された (表4 )。理論に束縛されるものではないが、これは、化学的に明白に異なる阻害剤が重複するS M O 残基と相互作用すること、及び阻害剤間の交差耐性が臨床にて生じ得ることを示唆する。

10

## 【0 4 4 4】

実施例7：薬物結合ポケットを越えるS M O 突然変異がビスモデギブ耐性を付与する

ビスモデギブ結合ポケットに対して遠位に位置するS M O 突然変異はまた、ビスモデギブ耐性と関連した (図1 4 A )。興味深いことに、S M O - T 2 4 1 M とS M O - A 4 5 9 V との両方が、確立されている発癌性突然変異よりも低い程度ではあるものの、S M O - W T と比べて増加した基礎活性を示す (図1 4 B )。この上昇した活性は、ビスモデギブ (図1 4 C 及び1 5 A )とP T C H 1 過剰発現 (図1 5 B )との両方による阻害に対する低減した感受性と相関し、S M O - T 2 4 1 M 及びS M O - A 4 5 9 V はビスモデギブのI C 5 0 をそれぞれ約3倍及び9倍シフトさせた。さらに、全ての試験した活性化突然変異が、S M O - W T に対して同等の細胞表面発現レベルにもかかわらず、ビスモデギブ結合障害を示した (図1 5 C 及び1 5 D )。

20

## 【0 4 4 5】

P P T C G N P アッセイを使用して、非D B P S M O 突然変異がビスモデギブの存在下で増殖に与える影響を調査した。C G N P を発現しているS M O - T 2 4 1 M 、S M O - A 4 5 9 V 、及びS M O W 5 3 5 L は、高濃度のビスモデギブにて増殖を続けた (図1 4 D 及び1 5 E )。これらのデータは、G P C R について観察されたように、S M O 構築を不安定化して、活性化を促進し、アンタゴニストへの親和性を低減する、D B P の外の突然変異と一致している (G e t h e r ら、1 9 9 7 )。しかしながら、例えばS M O - T 2 4 1 M の場合には基礎活性をわずかしか増大させなかつたこれらの突然変異によって、D B P に対する可能性のあるアロステリック効果を除外することはできない (図8 B )。P T C H 1 野生型であり発癌性S M O 突然変異を有したいいくつかのB C C (P T 0 1 、P T 0 7 、及びP T 1 1 由来)は、これらのS M O 突然変異がビスモデギブ阻害に対する感受性を低減するという事実にもかかわらず、最初治療に応答した (図1 5 A )。これは、S M O 突然変異体のビスモデギブへの感受性におけるP T C H 1 機能喪失に関する役割を示唆する。

30

## 【0 4 4 6】

実施例8：ビスモデギブ耐性を克服するための治療オプション

40

複数のS M O 突然変異がビスモデギブへの耐性を付与することができると確証したことを受け、次に化学的に明白に異なるS M O 阻害剤がビスモデギブ耐性を克服し得るかどうかを評価した。L Y 2 9 4 0 6 8 0 及びL D E 2 2 5 は、様々な癌に対して現在臨床試験中であり (C l i n i c a l t r i a l s . g o v )、化合物5は、S M O - D 4 7 3 H に対して前臨床での効力を示したS M O 阻害剤である (D i j k g r a a f ら、2 0 1 1 )。全ての化合物が同様にP P T C G N P を発現しているS M O - W T の増殖を阻害した一方で、S M O 突然変異体発現細胞は、程度は異なるものの、増殖を続けた (図1 6 A )。様々なS M O 阻害剤間のこの観察された交差耐性は構造予測と一致しており、S M O アンタゴニストを組み合わせることが後天的耐性を克服するために好適な治療オプショ

50

ンではないことを示唆する。さらに、再発性SUFU及び再発した腫瘍におけるGLI2変異体の同定は、SMOの下流のHh経路の標的化をさらに支持する。開発されているGLI阻害剤は現在のところ効力及びバイオアベイラビリティを欠くが、最近の研究により、プロモドメイン含有タンパク質BRD4が、GLIプロモーターを占有し、Hh経路の転写生産に必要とされることが見出された（Longら、2014；Tangら、2014）。ビスマデギブ耐性SMO突然変異体を発現しているPPT CGNPは、プロモドメイン阻害剤JQ1の存在下で低減した増殖を示す（図16B）。

#### 【0447】

##### 実施例2～9のための物質及び方法

###### 患者及び組織標本

10

連邦ガイドラインに従い、かつ臨床試験SHH3925、SHH4476g、及びSTERVIEに参加している協力センターの治験審査委員会によって承認された書面のインフォームドコンセントを受け取った後、ビスマデギブで治療した患者由来の試料を収集した。ビスマデギブ耐性機構の分析のため、これまでに記載のように（Lorussoloら、2011；Sekulicら、2012）、事前の治験責任医師が評価した治療の臨床的利益を経験した、局所進行性または転移性BCCを患う12人の患者から疾患増悪時に生検を得た。University of Michigan and Stanford UniversityのIRBによって承認されたプロトコルに従って比較のために、43人の非治療患者由来の生検を収集し、シーケンシングした。

20

#### 【0448】

###### 遺伝子分析

15個のビスマデギブ耐性BCC試料、48個の非治療BCC、及び52個の適合血液試料由来のDNAをWESに供した。腫瘍生検のWESを、67倍超の最低平均カバレッジで獲得した。コピー数を、SNPまたはCGHアレイによってビスマデギブ耐性BCCについて評価した。11個の耐性BCC試料由来のRNAをRNA-seqに供した。7個のFFPE試料由来のDNAをパイルシーケンス法によって分析した。5個の正常な皮膚試料（Proteogenex製）由来のRNA-seqデータを、BCC患者試料との比較のための基準遺伝子発現として使用した。

30

#### 【0449】

###### 動物

全てのマウスを、Genentech Inc.の動物使用ガイドラインならびにカリフォルニア州の法的及び倫理的実務を遵守する、Genentech Inc. institutional animal care and use committeeによって承認されたプロトコルに従って収容及び維持した。

30

#### 【0450】

###### 機能分析

SMO突然変異体を、記載のように（Dijkgraafら、2011；Yaučhら、2009）pRK5-SMOベクター中で生成し、記載のように（Dijkgraafら、2011）Gli-ルシフェラーゼレポーター-アッセイにおいて利用するか、または初代CGNP培養の形質導入のためにレンチウイルスベクターにクローニングするかのいずれかを行った。増殖を、メチル-[3H]-チミジン組み込みを使用してアッセイした（Koolら、2014）。[3H]-ビスマデギブのSMO突然変異体への結合を、記載のように（Dijkgraafら、2011）HEK-293細胞中で実行した。

40

#### 【0451】

###### 患者試料

連邦及び協力センターにある治験審査委員会（IRB）のガイドラインに従う書面のインフォームドコンセントを受け取った後、再発性腫瘍試料を収集した。非治療孤発性BCC試料を、University of MichiganのIRBによって承認されたプロトコルHUM0069052及びHUM00050085に従って収集した。非治療ゴーリン患者試料を、Stanford UniversityのIRBによって承認

50

されたプロトコル 2012-029 に従って収集した。

【0452】

組織学

FFPE 及び O.C.T. 化合物 (Tissue-Tek) に埋め込んだ試料を、標準的な手順に従って分割し、H&E 染色した。画像を、Zeiss Axioskop 2 顕微鏡 (Zeiss) を使用して得た。

【0453】

DNA 及び RNA 単離

凍結した BCC 腫瘍を、Bullet Blender (Next Advance) または Tissue Lyzer (Qiagen) のいずれかを使用して、溶解緩衝液 (Qiagen) を加えた RLT 中で均質化した。核酸を、製造業者のプロトコルに従って Allprep DNA / RNA Mini Kit (Qiagen) で単離した。FFPE 腫瘍切片を、Allprep DNA / RNA FFPE Kit (Qiagen) を使用して、マクロ解剖し、脱パラフィン化し、抽出した。

10

【0454】

エクソーム捕捉及びシーケンシング

エクソーム捕捉を、Agilent SureSelect (Santa Clara, CA) Human All Exome キット (50 Mb) を使用して行った。エクソーム捕捉ライブラリーを HiSeq 2000 ( Illumina, CA) 上でシーケンシングして、2 × 75 bp のペアエンドデータを生成した。

20

【0455】

変異体コーリング

エクソーム - Seq の読み値を、gsnap (Wu 及び Nacu, 2010) バージョン 2013-10-10 を「-M 2 -n 10 -B 2 -i 1 - - pair max - dna = 1000 - - terminal - threshold = 1000 - - gmap - mode = none - - clip - overlap」のパラメータで使用して、UCSC ヒトゲノム (GRCh37/hg19) に対して整列させた。ローカル再整列を、GATK Indel Realigner (DePristoら, 2011) を使用して行った。重複した読み値を、Picard を使用して除去した。腫瘍及び適合正常試料ファイルに対する体細胞突然変異体コーリングを、VariantTools 2 を初期設定パラメータで使用して行った (http://www.biocconduct.org/packages/release/bioc/html/VariantTools.html)。dbSNP Build 131 (Sherryら, 2001) において表されたが COSMIC v62 (Forbesら, 2010) においては不在であった既知の生殖系列変化形を、全ての試料についてフィルタリングして除外した。全ての非同義体細胞突然変異が遺伝子機能に与える影響を Condeel (Gonzalez-Perez and Lopez-Bigas, 2011) を使用して予測した。全ての変異体に Ensembl Release 63 を使用してアノテートした。

30

【0456】

RNA シーケンシング及びデータ分析

RNA - seq ライブラリーを、TrueSeq RNA Sample Preparation キット (Illumina, CA) を使用して調製した。このライブラリーを、レーン当たり 3 で多重化し、HiSeq 2000 上でシーケンシングして、試料当たり少なくとも約 3000 万のペアエンド (2 × 75 bp) 読み値を得た。RNA - seq 読み値を、gsnap (Wu 及び Nacu, 2010) バージョン 2013-10-10 を「-M 2 -n 10 -B 2 -i 1 - - N 1 -w 200000 -E 1 - - pair max - rna = 200000 - - clip - overlap」のパラメータで使用して、UCSC ヒトゲノム (GRCh37/hg19) に対して整列させた。遺伝子当たりの発現計数を、NCBI 及び Ensembl 遺伝子アノテーションならびに RefSeq mRNA 配列によって定義して、対内で一致し、各遺伝子座に対

40

50

して固有に整列している読み値の数を計数することによって得た。差次の遺伝子発現分析を、*Bioconductor DESeq2*パッケージ (Anders and Huber, 2010) を使用して行った。

#### 【0457】

##### 配列データ処理

全てのシーケンシング読み値を、*Bioconductor ShortRead*パッケージ (Morganら、2009) を使用して品質について検査した。全ての試料が正しく同定されたことを確認するために、全てのエクソーム及びRNA-seqデータ変異を交差比較し、*Bioconductor VariantTools2*パッケージを使用して遺伝子一貫性についてチェックした。全ての患者の対形成した試料は、正しく適合し、90%のカットオフを使用して、いずれの他の患者とも適合しなかった。

10

#### 【0458】

##### 比較ゲノムハイブリダイゼーション (CGH)

腫瘍試料を、*Agilent Human Genome CGH 1M*マイクロアレイ上でアッセイした。ヒト男性ゲノムDNA (Promega P/N G1471) を参照として使用した。バックグラウンド減算したシグナル強度の個々の $\log_2$ 比を、*Agilent Feature Extraction*ソフトウェアバージョン10.7 から得た。 $\log_2$ 比を、ゲノムGC量に1Mbのウインドウを使用して、GC量ウェーブ効果 (Diskinら、2008) について補正した。各プローブについての結果として得られた $\log_2$ 比の値を、一度に1試料及び1染色体で、*cghFLasso*アルゴリズム (Tibshirani及びWang, 2008) を使用してセグメント化した。セグメント化は、ラムダ1 = 0 及びラムダ2 = 1000 \* 現在の染色体のプローブの画分というパラメータを使用して行った。所与のセグメントのゲノム境界内の全てのプローブにそのセグメント内のプローブの平均コピー数値を付与した。

20

#### 【0459】

##### SNPアレイ

*Illumina HumanOmni 2.5-8*アレイを、(Rudinら、2012) によって開発された方法のこれまでに使用した変更したバージョンを使用して処理した。以前のように、正常な試料の大型パネルを使用して、各SNPについての2つのプローブの挙動を研究した。現在の分析には、450個の`Human`正常試料を使用した。以前のように、各試料における各プローブについての未加工シグナルを、所与の対立遺伝子の0、1、または2の正確な基調コピーが、*PICNIC*の隠れマルコフモデルによって求められるように、1、2、または3にマッピングされたスケールに変換した。各対立遺伝子に対するプローブA及びBについてのこれらの値を使用して、コピー数の比 (CNR、式1) 及びシータ (式2) を計算した。CNRは、所与の遺伝子座での全コピー数の、全体的な試料倍数性、すなわち、ゲノム全体にわたる平均コピー数の比として解釈することができる。CNR値を、ゲノムGC量に1Mbのウインドウを使用して、GC量ウェーブ効果 (Diskinら、2008) について補正した。

30

#### 【0460】

式1 :  $CNR = (A + B) / 4$

40

式2 :  $\text{シータ} = 2 / * \text{逆正接} (B / A)$

次に、CNR及びシータを*PICNIC*の前処理ステップに入力し、このステップでは、ゼロのコピーが存在するときのCNRについてのバックグラウンド値、通常細胞汚染から来るシグナルの画分、及び全ての調べたSNP位置にかけての大域倍数性または平均コピー数を見積もる。この見積りは、ゲノムにわたるCNRの最初のセグメント化を必要とする。本作業では、*CBS* (Venkatraman及びOlshen, 2007) または*PICNIC*の内部アルゴリズムのいずれよりも正確なセグメント化を提供することが分かっている *cghFLasso* (ラムダ1 = 0 及びラムダ2 = 1000のL2L1VitPath (Tibshirani及びWang, 2008)) を使用した。さらに、 $\text{シータ}$ 及び $\text{CNR}$ を見積もるための*PICNIC*の手順を補正して、染色体X及びYに

50

についての性別特異的予測コピー数(パイ)を使用した。最終的に、これら3つのパラメータについての分布前のP I C N I Cのオリジナルは、このアレイプラットフォームには不適切であることが分かった。代わりに、 $\alpha$ を、平均0.7及び標準偏差0.05でガウス分布としてモデル化し、 $\beta$ を、アルファパラメータ0.05及びベータパラメータ100でベータ分布としてモデル化し、 $\gamma$ を、形状パラメータ6.7143及びスケールパラメータ0.35でガンマ分布としてモデル化した。

## 【0461】

、 $\alpha$ 及び $\beta$ を各試料について見積もったら、P I C N I CのH M Mを適用して、データをセグメント化し、整数の対立遺伝子特異的コピー数を生成した。対立遺伝子特異的コピー数の小さい方が0と等しかったゲノムセグメントがL O Hの領域である。

10

## 【0462】

H M M適合は、ほとんどの試料中でほとんどの染色体について概して極めて正確であったが、C N Rがときに2つの隣り合った整数について予測された値の間であったことが観察された。これは、生物学的現実を反映していないと考えられる2つの隣り合ったH M M状態間でのジッターを産出した。これを解決するために、P I C N I CのH M Mによって産出された全コピー数の整数推定を、c g h F L a s s o ( C N R )によって産出された非制限値で置き換えた。報告された全コピー数を産出し、正常な汚染を調整するために、 $\alpha$ 、 $\beta$ 及び $\gamma$ の推定をP I C N I Cによりc g h F L a s s o結果に適用した：

式3。

## 【数1】

$$\delta = (1 - \alpha) / ((2\pi) + \phi(1 - \pi))$$

20

式4。

## 【数2】

$$CN_i = \left( (CNR_i - \alpha) / \delta - p_i \pi \right) / (1 - \pi)$$

## 【0463】

## 腫瘍細胞画分

腫瘍細胞画分を記載のように(N i k - Z a i n a l r a、2 0 1 2)計算した。簡潔に述べると、所与の突然変異を担持する腫瘍細胞を以下の式を使用して決定した：

30

## 【数3】

$$f = \frac{\pi}{R} \left( 1, \frac{r \rho \eta_T + (1 - \rho) \eta_N}{\rho} \right).$$

式中、 $r$ は、S N Pアレイによって決定した腫瘍細胞である生検における細胞の画分であり、 $r$ は、関心の塩基にわたる全読み値Rのうちの変異体対立遺伝子を報告する読み値の数であり、 $\eta_T$ 及び $\eta_N$ は、それぞれ、腫瘍中のその塩基でのゲノム及び正常なゲノムのコピー数である。全ての頻度をパーセンテージに変換した。いくつかの腫瘍細胞頻度は、このモデルが生殖系列突然変異またはコピー中立的なL O Hを考慮しないため、100%を超えた。検証した生殖系列突然変異について、汚染組織における異なる比の突然変異体読み値を考慮するように調整した。

40

## 【数4】

$$f = \frac{\pi}{R} \left( 1, \frac{r \rho \eta_T + (1 - \rho) \eta_N}{\rho} \right).$$

## 【0464】

## ビスモデギブ結合モデル

L Y 2 9 4 0 6 8 0が結合したS M Oの結晶構造(P D B I D : 4 J K V)がドッキングの開始点として働いた。M a e s t r oバージョン9.5(S c h r o d i n g e r, I n c .)において利用可能なプログラムのS c h r o d i n g e rスイートを使用して、P r e p W i zによるタンパク質調製、L i g p r e pによるビスモデギブのリガンド調製、G l i d e S t a n d a r d P r e c i s i o nによるドッキングを、G 1

50

ide ドッキングにおける以下の変更を除く全てのステップに初期設定パラメータを保持して実行した。ドッキング後の最小化を行うために 50 のポーズを含め、ストレイン補正項をオンにした。上位 10 個のポーズを分析用に書き出し、その全てが同様の結合様式を付与した。ビリジン及び隣接するオルトクロロフェニル環は、アミドねじれ角における変動がメチルスルホン及びその付着した環の位置におけるわずかな変動を引き起こしながらも、ほぼ同じ位置に留まった。最上位のポーズを本研究における数値に選択したが、上記の変動は、突然変異効果に関するいずれの解釈も変えなかつたであろう。図 2 B、3 A - C、5 A - B、及び 6 A を、MOE 2013.0801 (Chemical Computing Group, Inc.) を使用して準備した。結合ポケット及び Ile - 408 相互作用について示す表面積は、溶媒接触可能表面積である。

10

#### 【0465】

##### バイロシーケンシング

突然変異特異的 PCR (BSP) プライマーを、PyroMark Assay Design ソフトウェア v2.0 (Qiagen) を使用して設計した。PCR プライマーを、順方向プライマーまたは逆方向プライマーのいずれかに対する 5' ビオチン標識によって合成して、PCR 産物のストレプトアビシンセファロースピーズへの結合を促進した。シーケンシングプライマーを、PyroMark Assay Design ソフトウェア v2.0 (Qiagen) を使用して 5' - ビオチン標識 PCR プライマーの逆方向で設計した。ゲノム DNA (20 ng) を、Platinum PCR Supermix (Invitrogen) を使用して 25 μl の反応物中で増幅し、20 μl の PCR 産物を PyroMark Q24 (Qiagen) 上でのシーケンシングに使用した。PCR 産物を 10 分間ストレプトアビシンセファロースピーズとともにインキュベートした後、70% のエタノール、Pyromark 变性溶液、及び Pyromark 洗浄緩衝液で洗浄した。次に、变性した PCR 産物を、0.3 μM のシーケンシングプライマーを使用してシーケンシングした。パイルグラムを可視化し、配列品質について検査し、SMO 位置 T241、L412、A549、及び C469 での突然変異体パーセントを、PyroMark ソフトウェアバージョン 2.0.4 (Qiagen) を使用して決定した。

20

#### 【0466】

##### コピー数アッセイ

ゲノム DNA を、血液、治療前腫瘍試料、及び治療後腫瘍試料から単離し、反応当たり 10 ng を 4 連 Taqman アッセイ (Applied Biosystems / Life Technologies) において鑄型として使用して、CopyCaller ソフトウェア (Applied Biosystems / Life Technologies) を用いて PTC1 及び RNASE P (参照) コピー数を決定した。

30

#### 【0467】

##### リアルタイム RT - PCR

全 RNA の 1 ~ 4 μg を、大容量 cDNA キット (Applied Biosystems / Life Technologies) を使用して逆転写した。定量的 PCR 反応を、TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems / Life Technologies) を使用して行った。遺伝子特異的 Taqman プライマー / プローブ配列は、要請に応じて利用可能である。

40

#### 【0468】

##### プラスミド

SMO 点突然変異体を、QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) によって pRK5-SMO において生成した。SMO 点突然変異体を pRK5-SMO-Flag 及び pRK7-gD-SMO-myc にクローニングした。pRK5-PTC1 及び pRK5-eGFP は、(Yauuchiら、2009) によってこれまでに記載されている。Hhルシフェラーゼレポーター Gli - BS コンストラクトは (Muroneら、1999) によってこれまでに記載されており、ウミシイタケトランスフェクション対照プラスミド pRL-TK は

50

Promeg a製である。pGEIGCは、pGIPZ (Open Biosystems) のZeo<sup>R</sup>-CMV<sub>ie</sub>-tGFP-IRES-Puro<sup>R</sup>-shRNA-WRE内容物を、EF1プロモーターを含む断片、多重クローニング部位 (MCS) 、内部リボソーム侵入部位 (IRES) 、及び高感度緑色蛍光タンパク質のC末端に融合したCre-リコンビナーゼ (eGFP-Cre; Harfeら、2004) で代置することによって創出したHIV系自己不活性化レンチウイルスベクターである。全てのコンストラクトをシーケンシングによって確認し、クローニングの詳細、ベクターマップ、及び配列ファイルは、要請に応じて利用可能である。

## 【0469】

ルシフェラーゼレポーターアッセイ

C3H10T1/2細胞 (ATCC) を、4 mMのグルタミン、10 mMのHepes (pH 7.2) 、及び10%のFBSを含むDMEM High Glucose中で1.75 × 10<sup>5</sup> × 10<sup>5</sup>細胞 / ウェルにて6ウェルプレートに播種した。16時間後、細胞を、GeneJuice Transfection Reagent (Novagen) を使用して、400 ngの発現コンストラクト、400 ngの9x-Gli-BS、及び200 ngのpRL-TKでトランスフェクトした。PTCH1阻害実験のため、細胞を、200 ngのSMO発現コンストラクト、及びPTCH1対空ベクターの様々な比を含むさらに200 ngのDNAでトランスフェクトした。6時間後、1つのウェルからの細胞をトリプシン処理し、12ウェルプレートの4つのウェルにわたって再分配した。16時間後、培地のFBS量を0.5%に低減させて、一次纖毛の形成を誘導し、小分子Hh阻害剤をインキュベーション濃度で添加した。蛍ルシフェラーゼ活性を、Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega) を用いて24時間後に決定し、Wallac EnVision plate reader (Perkin Elmer) を使用して読み取った。値をウミシイタケルシフェラーゼ活性で割り、トランスフェクション効率について正規化した。個々の実験を2連または3連で実行し、少なくとも1回繰り返した。用量応答データを、GraphPad Prism中で4パラメータ方程式に適合させた：

## 【数5】

$$Y = 1 + \frac{1-B}{(1+10^{\frac{1}{(1+10^{\frac{1}{(C_{50}-X)H_1})}}})},$$

式中、「Y」は正規化したGli-ルシフェラーゼシグナルまたは正規化したチミジン組み込み（阻害剤を含まなかった対照の画分として計算した）であり、「X」は阻害剤濃度である。上及び下（B）の値は、各試料について等しくなくてはならない。「H」は丘の傾斜である。

## 【0470】

[<sup>3</sup>H]-ビスモデギブ結合アッセイ

2 × 10<sup>6</sup> HEK-293細胞を10 cmプレートに播種し、16時間後にGeneJuice (Novagen) を使用して3 μgの空ベクターまたはSMO発現コンストラクトのいずれかでトランスフェクトした。細胞を、40時間後に1 mMのEDTAを含むPBS中で採取し、室温 (RT) で10時間、4%のPFAを含むPBS中に固定した後、これらを1 mMのEDTAを含むPBS中で3回洗浄し、ウェル当たり100,000細胞で96ウェルプレートにプレーティングした。細胞を、50 μMの非標識ビスモデギブの非存在下または存在下で、RTで1時間、5 nMの[<sup>3</sup>H]-ビスモデギブ (Selecia) とともにインキュベートし、続いて、Filtermate Cell harvester (Perkin Elmer) を使用してフィルタープレート (Perkin Elmer) に移した。ウェル当たり40 μmのMicroScint fluid (Perkin Elmer) を加え、1分当たりの計数を、PerkinElmer TopCount NXTを使用して評価した。全ての試料を3連で分析した。特異的結合を、全結合から非特異的結合を減算することによって過剰の非標識ビスモデギブとの競合の後に計算した。

10

20

30

40

50

## 【0471】

## gD-SMO細胞表面発現のFACS分析

1 × 10<sup>6</sup> HEK-293細胞を10cmプレートに播種し、6時間後にGene Juice (Novagen) を使用して3μgのgD-SMO発現コンストラクトでトランسفェクトした。細胞を、48時間後に1mMのEDTAを含むPBS中で取り除いた後、抗gD抗体 (5B6、1μg/mlにて)とともに30分間インキュベートし、1:100のビオチン-SPコンジュゲートAffinipureヤギ抗マウスIgG、及び1:50のR-フィコエリトリンコンジュゲートストレプトアビジン (ともにJackson Immunoresearch Labs)とともに2回の20分のインキュベーションを続けた。細胞をヨウ化プロピジウム (500ng/ml) 中に再懸濁し、HTS FacsCalibur (BD Biosciences) 上で分析した。

10

## 【0472】

## ウイルス產生及び力価決定

HEK-293T細胞を、トランسفェクションの24時間前に、10%の加熱不活性化したFBSを含むDMEM High Glucose 中で1.5 × 10<sup>6</sup>細胞/プレートにて15cm皿にプレーティングした。レンチウイルス上清を、6μgのpGEIGC-SMO、12μgのパッケージングベクター Zuffereyら、1997)、3μgのエンベロープベクター pHSV-G (Clontech)、及びトランسفェクション試薬GeneJuice (Novagen) を使用してコトランسفェクションによって調製した。培地をトランسفェクションから12後に置き換え、ウイルス上清を24時間後に収集し、0.45μmのPESフィルター (Nalgene) を通して濾過し、さらなる処理まで4℃で保管した。ウイルス上清を、1時間30分、100,000 × gでの超遠心分離によって200倍に濃縮した (Zufferey 及び Trono、2000)。ウイルスペレットをCGNP媒体中に再懸濁し、-80℃で保管した。ウイルス力価を、6ウェルプレートに2 × 10<sup>5</sup>細胞/ウェルでプレーティングしたHEK-293T細胞について決定した。細胞を12時間接着させた後、培地を、2mlの1:400希釈または1:4000希釈のいずれかのウイルス濃縮物で置き換えた。ウェル当たりの細胞の数をウイルス添加時に計数し、6ウェルの平均を使用してウイルス力価を計算した。ウイルス上清を60時間細胞上に留めた後、細胞を採集し、FACSによって蛍光タンパク質発現について分析した。ウイルス力価を、方程式 [細胞数 / 100 × 蛍光細胞%] × 1000 (ウイルス濃縮物1μl当たり) に従って形質導入単位 (TU) / mlで計算した (Zufferey 及び Trono、2000)。15%より少ない蛍光細胞をもたらした形質導入のみを力価計算に使用した。

20

30

## 【0473】

## マウス

Ptch1loxP株は、R. Toftgård and S. Teglund (Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden; Kasperら、2011)からの寛大な贈与であった。Tp53<sup>10xP</sup>株は、A. Berns (Netherlands Cancer institute, Amsterdam, The Netherlands; Jonkersら、2001)からの寛大な贈与であった。Rosa26<sup>LSL-tdTomato</sup>株は、Jackson Labs (在庫番号007909; Madisenら、2010)から購入した。全てのマウスは、カリフォルニア州の法的及び倫理的実務を遵守する、Genentech Inc. の動物使用ガイドラインに従って収容及び維持した。

40

## 【0474】

## CGNPの単離及び形質導入

生後5~7日のPtch1<sup>10xP/10xP</sup> Rosa26<sup>LSL-tdTomato</sup> Tp53<sup>10xP/10xP</sup>マウスからの小脳を0.05%のトリプシン中で10分間37℃にて解離させた。細胞を、10分間4℃の514×gでの遠心分離によって収集し、CGNP培地 (1×B27 (ビタミンAなし、Life Technologies

50

)、0.45%のグルコース(Sigma Aldrich)、25mMのKCl、0.4%ウシ血清アルブミン(Sigma Aldrich)、2mMのグルタミン、100U/mlのペニシリン(Life Technologies)、100 $\mu$ g/mlのストレプトマイシン(Life Technologies)、200ng/mlのオクチル化組換えSHHを含む、Neurobasal培地(Life Technologies)中に再懸濁し、0.45 $\mu$ mのフィルター(Falcon)を通して濾過した。細胞をポリ-D-リジンをコーティングした6ウェルプレート(Corning)中に5 $\times$ 10E5細胞/ウェルでプレーティングし、1の感染多度(MOI)でレンチウイルスに感染させた。24時間後、細胞をトリプシン処理によって採集し、CGNP培地中に収集し、下流用途のために再度プレーティングした。

10

#### 【0475】

##### メチル-[3H]-チミジン組み込み

HPVが増殖に与える影響を検査するために、ウイルス的形質導入したCGNPを、SHHを含まないCGNP培地中で25,000細胞/ウェルにてポリ-D-リジンでコーティングした96ウェルプレート(Corning)にプレーティングした。阻害剤濃度を3連ウェルにおいて試験すると、ビスマデギブについて25、50、100、250、500、1000、及び5000nM、LDE225について500nM、LY2940680について500nM、化合物5について500nM、JQ1について1 $\mu$ M、及びDMSO(最高濃度のビヒクル対照)について0.1%であった。24時間後、細胞を1 $\mu$ Ci/mlメチル-[3H]-チミジン(Amersham/GE Healthcare)でパルスして、さらに16~24時間培養した。細胞を、Filtermate Cell Harvester(Perkin Elmer)を使用して96ウェルフィルタープレート(Perkin Elmer)上に採集し、組み込まれた放射能をTopCount NXT(Perkin Elmer)上で液体シンチレーション分光測光法によって定量化した。

20

#### 【0476】

##### 化合物

GDC-0449、化合物5、及びJQ-1を、WO2006028956、WO2007059157、及びFilippakopoulosら、2010に記載のように調製した。LDE225(HY-16582)及びLY2940680(HY-13242)はMedchemExpress製であった。

30

#### 【0477】

##### 引用文献

Amakye, D., Jagani, Z., and Dorsch, M. (2013). Unraveling the therapeutic potential of the Hedgehog pathway in cancer. *Nature medicine* 19, 1410-1422.

Atwood, S. X., Li, M., Lee, A., Tang, J. Y., and Oro, A. E. (2013). GLI activation by atypical protein kinase C iota/lambda regulates the growth of basal cell carcinomas. *Nature* 494, 484-488.

Brastianos, P. K., Horowitz, P. M., Santagata, S., Jones, R. T., McKenna, A., Getz, G., Ligon, K. L., Palescandolo, E., Van Hummelen, P., Ducar, M. D., et al. (2013). Genomic sequencing of meningiomas identifies oncogenic SMO and AKT1 mutations. *Nature genetics* 45, 285-289.

40

Brinkhuizen, T., Reinders, M. G., van Geel, M

50

., Hendriksen, A. J., Paulussen, A. D., Winnepenninckx, V. J., Keymeulen, K. B., Soetekouw, P. M., van Steensel, M. A., and Mosterd, K. (2014). Acquired resistance to the Hedgehog pathway inhibitor vismodegib due to smoothed mutations in treatment of locally advanced basal cell carcinoma. *Journal of the American Academy of Dermatology*.

Buonamici, S., Williams, J., Morrissey, M., Wang, A., Guo, R., Vattay, A., Hsiao, K., Yuan, J., Green, J., Ospina, B., et al. (2010). Interfering with resistance to smoothed antagonists by inhibition of the PI3K pathway in medulloblastoma. *Sci Transl Med* 2, 51ra70.

Chang, A. L., and Oro, A. E. (2012). Initial assessment of tumor regrowth after vismodegib in advanced Basal cell carcinoma. *Archives of dermatology* 148, 1324-1325.

Clark, V. E., Erson-Omay, E. Z., Serin, A., Yin, J., Cotney, J., Ozduman, K., Avsar, T., Li, J., Murray, P. B., Henegariu, O., et al. (2013). Genomic analysis of non-NF2 meningiomas reveals mutations in TRAF7, KLF4, AKT1, and SMO. *Science* 339, 1077-1080.

Das Thakur, M., and Stuart, D. D. (2013). The evolution of melanoma resistance reveals therapeutic opportunities. *Cancer research* 73, 6106-6110.

Dijkgraaf, G. J., Allick, B., Weinmann, L., Juanario, T., West, K., Modrusan, Z., Burdick, D., Goldsmith, R., Robarge, K., Sutherlin, D., et al. (2011). Small molecule inhibition of GDC-0449 refractory smoothed mutants and downstream mechanisms of drug resistance. *Cancer research* 71, 435-444.

Gether, U., Ballesteros, J. A., Seifert, R., Sanders-Bush, E., Weinstein, H., and Kobilka, B. K. (1997). Structural instability of a constitutively active G protein-coupled receptor. Agonist-independent activation due to conformational flexibility. *The Journal of biological chemistry* 272, 2587-2590.

Gonzalez-Perez, A., and Lopez-Bigas, N. (2011). Improving the assessment of the outcome of nonsynonymous SNVs with a consensus deleteriousness score, Condel. *American journal of human genetics* 88, 440-449.

Greenman, C. D., Bignell, G., Butler, A., Edki 50

ns, S., Hinton, J., Beare, D., Swamy, S., Santarius, T., Chen, L., Widaa, S., et al. (2010). PICNIC: an algorithm to predict absolute allelic copy number variation with microarray cancer data. *Biostatistics* 11, 164-175.

Hahn, H., Wicking, C., Zaphiroopoulos, P.G., Gailani, M.R., Shanley, S., Chidambaram, A., Vorobchovsky, I., Holmberg, E., Uden, A.B., Gillies, S., et al. (1996). Mutations of the human homolog of *Drosophila patched* in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cancer* 85, 841-851.

Inukai, M., Toyooka, S., Ito, S., Asano, H., Ichihara, S., Soh, J., Suehisa, H., Ouchida, M., Aoe, K., Aoe, M., et al. (2006). Presence of epidermal growth factor receptor gene T790M mutation as a minor clone in non-small cell lung cancer. *Cancer research* 66, 7854-7858.

Jayaraman, S. S., Rayhan, D. J., Hazany, S., and Kolodney, M. S. (2014). Mutational landscape of basal cell carcinomas by whole-exome sequencing. *The Journal of Investigative Dermatology* 134, 213-220.

Johnson, R. L., Rothman, A. L., Xie, J., Goodrich, L. V., Bare, J. W., Bonifas, J. M., Quinn, A. G., Myers, R. M., Cox, D. R., Epstein, E. H., Jr., and Scott, M. P. (1996). Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science* 272, 1668-1671.

Kandoth, C., McLellan, M.D., Vandine, F., Ye, K., Niu, B., Lu, C., Xie, M., Zhang, Q., McMichael, J.F., Wyczalkowski, M.A., et al. (2013). Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* 502, 333-339.

Katritch, V., Cherezov, V., and Stevens, R.C. (2013). Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily. Annual review of pharmacology and toxicology 53, 531-556.

Kijima, C., Miyashita, T., Suzuki, M., Oka, H., and Fujii, K. (2012). Two cases of nevoid basal cell carcinoma syndrome associated with meningioma caused by a PTCH1 or SUFU germline mutation. *Fam Cancer* 11, 565-570.

Kool, M., Jones, D.T., Jager, N., Northcott, P.A., Pugh, T.J., Hovestadt, V., Piro, R.M., Esparza, I.A., Markant, S.I., Remke, M. et al. (2

014). Genome Sequencing of SHH Medulloblastoma Predicts Genotype-Related Response to Smoothened Inhibition. *Cancer cell* 25, 393-405.

Lackner, M. R., Wilson, T. R., and Settleman, J. (2012). Mechanisms of acquired resistance to targeted cancer therapies. *Future Oncol* 8, 999-1014.

Lee, Y., Kawagoe, R., Sasai, K., Li, Y., Russell, H. R., Curran, T., and McKinnon, P. J. (2007). Loss of suppressor-of-fused function promotes tumorigenesis. *Oncogene* 26, 6442-6447.

Long, J., Li, B., Rodriguez-Blanco, J., Pastorini, C., Volmar, C. H., Wahlestedt, C., Capobianco, A., Bai, F., Pei, X. H., Ayad, N. G., and Robbins, D. J. (2014). The BET bromodomain inhibitor I-BET151 acts downstream of Smoothened to abrogate the growth of Hedgehog driven cancers. *The Journal of biological chemistry* 20.

LoRusso, P. M., Rudin, C. M., Reddy, J. C., Tibus, R., Weiss, G. J., Borad, M. J., Hann, C. L., Brumer, J. R., Chang, I., Darbonne, W. C., et al. (2011). Phase I trial of hedgehog pathway inhibitor vismodegib (GDC-0449) in patients with refractory, locally advanced or metastatic solid tumors. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 17, 2502-2511.

Metcalf, C., Allick, B., Crow, A., Lamoureux, M., Dijkgraaf, G. J., Peale, F., Gould, S. E., and de Sauvage, F. J. (2013). PTEN loss mitigates the response of medulloblastoma to Hedgehog pathway inhibition. *Cancer research* 73, 7034-7042.

Miller, J. H. (1985). Mutagenic specificity of ultraviolet light. *J Mol Biol* 182, 45-65.

Nedelcu, D., Liu, J., Xu, Y., Jao, C., and Salic, A. (2013). Oxysterol binding to the extracellular domain of Smoothened in Hedgehog signaling. *Nature chemical biology* 9, 557-564.

Negrini, S., Gorgoulis, V. G., and Halazonetis, T. D. (2010). Genomic instability - an evolving hallmark of cancer. *Nature reviews Molecular cell biology* 11, 220-228.

Nik-Zainal, S., Van Loo, P., Wedge, D. C., Ale 50

x androv, L. B., Greenman, C. D., Lau, K. W., Rainey, K., Jones, D., Marshall, J., Ramakrishna, M., et al. (2012). The life history of 21 breast cancers. *Cell* 149, 994-1007.

Oro, A. E., Higgins, K. M., Hu, Z., Bonifas, J. M., Epstein, E. H., Jr., and Scott, M. P. (1997). Basal cell carcinomas in mice overexpressing sonic hedgehog. *Science* 276, 817-821.

Pastorino, L., Ghiorzo, P., Nasti, S., Battistuzzi, L., Cusano, R., Marzocchi, C., Garre, M. L., Clementi, M., and Scarra, G. B. (2009). Identification of a SUFU germline mutation in a family with Gorlin syndrome. *Am J Med Genet A* 149A, 1539-1543.

Pesz, K. A., Bieniek, A., Makowska, I., and Sasadek, M. M. (2013). Basal cell carcinoma of the skin: whole genome screening by comparative genome hybridization revisited. *Journal of cutaneous pathology* 40, 25-29.

Pricl, S., Cortelazzi, B., Dal Col, V., Marson, D., Laurini, E., Fermeglia, M., Licittra, L., Pilotto, S., Bossi, P., and Perrone, F. (2014). Smoothened (SMO) receptor mutations dictate resistance to vismodegib in basal cell carcinoma. *Molecular oncology*.

Reifenberger, J., Wolter, M., Knobbe, C. B., Kohler, B., Schonickel, A., Scharwachter, C., Kumar, K., Blaschke, B., Ruzicka, T., and Reifenberger, G. (2005). Somatic mutations in the PTCH, SMOH, SUFUH and TP53 genes in sporadic basal cell carcinomas. *Br J Dermatol* 152, 43-51.

Reifenberger, J., Wolter, M., Weber, R. G., Megahed, M., Ruzicka, T., Lichter, P., and Reifenberger, G. (1998). Missense mutations in SMOH in sporadic basal cell carcinomas of the skin and primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Cancer research* 58, 1798-1803.

Sasai, K., Romer, J. T., Lee, Y., Finkelstein, D., Fuller, C., McKinnon, P. J., and Curran, T. (2006). Shh pathway activity is down-regulated in cultured medulloblastoma cells: implications for preclinical studies. *Cancer research* 66, 4215-4222.

Sekulic, A., Migden, M. R., Oro, A. E., Dirix, L., Lewis, K. D., Hainsworth, J. D., Solomon, J. A., Yoo, S., Arron, S. T., Friedlander, P. A., et al. (2012). Efficacy and safety of vismodegib

10

20

30

40

50

g i b i n a d v a n c e d b a s a l - c e l l c a r c i n o m a . T h e N e w E n g l a n d j o u r n a l o f m e d i c i n e 3 6 6 , 2 1 7 1 - 2 1 7 9 .

Smith , M . J . , Beetz , C . , Williams , S . G . , B h a s k a r , S . S . , O ' S u l l i v a n , J . , A n d e r s o n , B . , D a l y , S . B . , U r q u h a r t , J . E . , B h o l a h , Z . , O u d i t , D . , et a l . ( 2 0 1 4 ) . G e r m l i n e M u t a t i o n s i n S U F U C a u s e G o r l i n S y n d r o m e - A s s o c i a t e d C h i l d h o o d M e d u l l o b l a s t o m a a n d R e d e f i n e t h e R i s k A s s o c i a t e d W i t h P T C H 1 M u t a t i o n s . J o u r n a l o f c l i n i c a l o n c o l o g y : o f f i c i a l j o u r n a l o f t h e A m e r i c a n S o c i e t y o f C l i n i c a l O n c o l o g y . 10

S t j e r n q v i s t , S . , R y d e n , T . , a n d G r e e n m a n , C . D . ( 2 0 1 1 ) . M o d e l - i n t e g r a t e d e s t i m a t i o n o f n o r m a l t i s s u e c o n t a m i n a t i o n f o r c a n c e r S N P a l l e l i c c o p y n u m b e r d a t a . C a n c e r i n f o r m a t i c s 1 0 , 1 5 9 - 1 7 3 .

S t o n e , D . M . , M u r o n e , M . , L u o h , S . , Y e , W . , A r m a n n i , M . P . , G u r n e y , A . , P h i l l i p s , H . , B r u s h , J . , G o d d a r d , A . , d e S a u v a g e , F . J . , a n d R o s e n t h a l , A . ( 1 9 9 9 ) . C h a r a c t e r i z a t i o n o f t h e h u m a n s u p p r e s s o r o f f u s e d , a n e g a t i v e r e g u l a t o r o f t h e z i n c - f i n g e r t r a n s c r i p t i o n f a c t o r G l i . J o u r n a l o f c e l l s c i e n c e 1 1 2 ( P t 2 3 ) , 4 4 3 7 - 4 4 4 8 . 20

S v a r d , J . , H e b y - H e n r i c s o n , K . , P e r s s o n - L e k , M . , R o z e l l , B . , L a u t h , M . , B e r g s t r o m , A . , E r i c s o n , J . , T o f t g a r d , R . , a n d T e g l u n d , S . ( 2 0 0 6 ) . G e n e t i c e l i m i n a t i o n o f S u p p r e s s o r o f f u s e d r e v e a l s a n e s s e n t i a l r e p r e s s o r f u n c t i o n i n t h e m a m m a l i a n H e d g e h o g s i g n a l i n g p a t h w a y . D e v e l o p m e n t a l c e l l 1 0 , 1 8 7 - 1 9 7 . 30

S w e e n e y , R . T . , M c C l a r y , A . C . , M y e r s , B . R . , B i s c o c h o , J . , N e a h r i n g , L . , K w e i , K . A . , Q u , K . , G o n g , X . , N g , T . , J o n e s , C . D . , et a l . ( 2 0 1 4 ) . I d e n t i f i c a t i o n o f r e c u r r e n t S M O a n d B R A F m u t a t i o n s i n a m e l o b l a s t o m a s . N a t u r e g e n e t i c s 4 6 , 7 2 2 - 7 2 5 .

T a n g , Y . , G h o l a m i n , S . , S c h u b e r t , S . , W i l l a r d s o n , M . I . , L e e , A . , B a n d o p a d h a y a y , P . , B e r g t h o l d , G . , M a s o u d , S . , N g u y e n , B . , V u e , N . , et a l . ( 2 0 1 4 ) . E p i g e n e t i c t a r g e t i n g o f H e d g e h o g p a t h w a y t r a n s c r i p t i o n a l o u t p u t t h r o u g h B E T b r o m o d o m a i n i n h i b i t i o n . N a t u r e m e d i c i n e 2 0 , 7 3 2 - 7 4 0 . 40

T a y l o r , M . D . , L i u , L . , R a f f e l , C . , H u i , C . C . , M a i n p r i z e , T . G . , Z h a n g , X . , A g a t e p , R . , C h i a p p a , S . , G a o , L . , L o w r a n c e , A . , et a l . ( 2 0 0 2 ) . M u t a t i o n s i n S U F U p r e d i s p o s e t o m e d u l l o b l a s t 50

oma. *Nature genetics* 31, 306-310.

Wang, C., Wu, H., Katriitch, V., Han, G.W., Huang, X.P., Liu, W., Siu, F.Y., Roth, B.L., Cherezov, V., and Stevens, R.C. (2013). Structure of the human smoothened receptor bound to an antitumour agent. *Nature* 497, 338-343.

Wang, G.Y., So, P.L., Wang, L., Libove, E., Wang, J., and Epstein, E.H., Jr. (2011). Establishment of murine basal cell carcinoma allografts: a potential model for preclinical drug testing and for molecular analysis. *The Journal of investigative dermatology* 131, 2298-2305.

Wechsler-Reya, R.J., and Scott, M.P. (1999). Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron* 22, 103-114.

Wong, H., Allickie, B., West, K.A., Pacheco, P., La, H., Januario, T., Yauch, R.L., de Sauvage, F.J., and Gould, S.E. (2011). Pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis of vismodegib in preclinical models of mutational and ligand-dependent Hedgehog pathway activation. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 17, 4682-4692.

Xie, J., Murone, M., Luoh, S.M., Ryan, A., Gu, Q., Zhang, C., Bonifas, J.M., Lam, C.W., Hynes, M., Goddard, A., et al. (1998). Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma. *Nature* 391, 90-92.

Yauch, R.L., Dijkgraaf, G.J., Allickie, B., Januario, T., Ahn, C.P., Holcomb, T., Pujara, K., Stinson, J., Callahan, C.A., Tang, T., et al. (2009). Smoothed mutation confers resistance to a Hedgehog pathway inhibitor in medulloblastoma. *Science* 326, 572-574.

Anders, S., and Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome biology* 11, R106.

DePristo, M.A., Banks, E., Poplin, R., Garimella, K.V., Maguire, J.R., Hartl, C., Philippakis, A.A., del Angel, G., Rivas, M.A., Hanna, M., et al. (2011). A framework for variation discovery and genotyping using next---generation DNA sequencing data. *Nature genetics* 43, 491---498.

Diskin, S.J., Li, M., Hou, C., Yang, S., Glessner, J., Hakonarson, H., Bucan, M., Maris, J.M., and Wang, K. (2008). Adjustment of genomic

10

20

30

40

50

waves in signal intensities from whole--genome SNP genotyping platforms. *Nucleic acids research* 36, e126.

Filippakopoulos, P., Qi, J., Picaud, S., Shen, Y., Smith, W.B., Fedorov, O., Morse, E.M., Keates, T., Hickman, T.T., Fellez, T., et al. (2010). Selective Inhibition of BET bromodomains. *Nature* 468, 1067--1073.

Forbes, S.A., Bindal, N., Bamford, S., Cole, C., Kok, C.Y., Beare, D., Jia, M., Shepherd, R., Leung, K., Menzies, A., et al. (2011). COSMIC: mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. *Nucleic acids research* 39, D945--950.

Forbes, S.A., Tang, G., Bindal, N., Bamford, S., Dawson, E., Cole, C., Kok, Y., Jia, M., Ewing, R., Menzies, A., et al. (2010). COSMIC (the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer): a resource to investigate acquired mutations in human cancer. *Nucleic acids research* 38, D652-657.

Gonzalez---Perez, A., and Lopez---Bigas, N. (2011). Improving the assessment of the outcome of nonsynonymous SNVs with a consensus deleteriousness score, Condel. *American journal of human genetics* 88, 440-449.

Harfe, B.D., Scherz, P.J., Nissim, S., Tian, H., McMahon, A.P., and Tabin, C.J. (2004). Evidence for an expansion-based temporal Shh gradient in specifying vertebrate digit identities. *Cell* 118, 517-528.

Jonkers, J., Meuwissen, R., van der Gulden, H., Peterse, H., van der Valk, M., and Berns, A. (2001). Synergistic tumor suppressor activity of BRCA2 and p53 in a conditional mouse model for breast cancer. *Nature genetics* 29, 418-425.

Kasper, M., Jaks, V., Are, A., Bergstrom, A., Schwager, A., Svard, J., Teglund, S., Barker, N. and Toftgård, R. (2011). Wounding enhances epidermal tumorigenesis by recruiting hair follicle keratinocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 4099-4104.

Madisen, L., Zwingman, T.A., Sunkin, S.M., Oh, S.W., Zariwala, H.A., Gu, H., Ng, L.L., Palmiter, R.D., Hawrylycz, M.J., Jones, A.R., et al. (2010). *Nature neuroscience* 13, 133-140.

Morgan, M., et al. (2009). *Bioinformatics* 25, 50.

5 , 2 6 0 7 - 2 6 0 8 .  
M u r o n e , M . e t a l . , ( 1 9 9 9 ) . C u r r e n t b i o l o g y :  
C B 9 , 7 6 - 8 4 .  
R u d i n , C e t a l . , ( 2 0 1 2 ) . N a t u r e g e n e t i c s 4  
4 , 1 1 1 1 - 1 1 1 6 .  
S h e r r y , S e t a l . , ( 2 0 0 1 ) . N u c l e i c a c i d s r e  
s e a r c h 2 9 , 3 0 8 - 3 1 1 .  
T i b s h i r a n i , R . , a n d W a n g , P . ( 2 0 0 8 ) . B i o s t a t  
i s t i c s 9 , 1 8 - 2 9 .  
V e n k a t r a m a n , E . e t a l . , ( 2 0 0 7 ) . B i o i n f o r m a t  
i c s 2 3 , 6 5 7 - 6 6 3 .  
W u , T . e t a l . , ( 2 0 1 0 ) . B i o i n f o r m a t i c s 2 6 , 8 7  
3 - 8 8 1 .

#### 【 0 4 7 8 】

##### 参照による組み込み

本明細書で言及する全ての出版物及び特許は、個々の出版物または特許の各々が参照により組み込まれることが具体的かつ個別に示されたかのように、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【 0 4 7 9 】

主題の開示の特定の実施形態を考察してきたが、上の明細書は例示的であって限定的ではない。本明細書及び以下の特許請求の範囲を概観すると、当業者には本開示の多くの変形が明らかとなるであろう。本開示の全範囲は、均等物の全範囲と併せた特許請求の範囲、及びそのような変形と併せた明細書を参照することによって決定されるべきである。前述の実施例は、例示目的のものであるに過ぎず、添付の特許請求の範囲によって定義される本開示の範囲を限定するものとみなされるべきでない。

#### 【 0 4 8 0 】

##### 配列リスト

配列番号 1 - - ヒト野生型スマースンドアミノ酸配列 ( G e n B a n k 受託番号 N P \_ 0  
0 5 6 2 2 . 1 )

#### 【 配列表 1 - 1 】

#### 【 0 4 8 1 】

20

30

Met Ala Ala Ala Arg Pro Ala Arg Gly Pro Glu Leu Pro Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu  
 Leu Leu Gly Asp Pro Gly Arg Gly Ala Ala Ser Ser Gly Asn Ala Thr Gly Pro Gly Pro Arg  
 Ser Ala Gly Gly Ser Ala Arg Arg Ser Ala Ala Val Thr Gly Pro Pro Pro Pro Leu Ser His  
 Cys Gly Arg Ala Ala Pro Cys Glu Pro Leu Arg Tyr Asn Val Cys Leu Gly Ser Val Leu Pro  
 Tyr Gly Ala Thr Ser Thr Leu Leu Ala Gly Asp Ser Asp Ser Gln Glu Glu Ala His Gly Lys  
 Leu Val Leu Trp Ser Gly Leu Arg Asn Ala Pro Arg Cys Trp Ala Val Ile Gln Pro Leu Leu  
 Cys Ala Val Tyr Met Pro Lys Cys Glu Asn Asp Arg Val Glu Leu Pro Ser Arg Thr Leu Cys  
 Gln Ala Thr Arg Gly Pro Cys Ala Ile Val Glu Arg Glu Arg Gly Trp Pro Asp Phe Leu Arg  
 Cys Thr Pro Asp Arg Phe Pro Glu Gly Cys Thr Asn Glu Val Gln Asn Ile Lys Phe Asn Ser  
 Ser Gly Gln Cys Glu Val Pro Leu Val Arg Thr Asp Asn Pro Lys Ser Trp Tyr Glu Asp Val  
 Glu Gly Cys Gly Ile Gln Cys Gln Asn Pro Leu Phe Thr Glu Ala Glu His Gln Asp Met His  
 Ser Tyr Ile Ala Ala Phe Gly Ala Val Thr Gly Leu Cys Thr Leu Phe Thr Leu Ala Thr Phe  
 Val Ala Asp Trp Arg Asn Ser Asn Arg Tyr Pro Ala Val Ile Leu Phe Tyr Val Asn Ala Cys  
 Phe Phe Val Gly Ser Ile Gly Trp Leu Ala Gln Phe Met Asp Gly Ala Arg Arg Glu Ile Val  
 Cys Arg Ala Asp Gly Thr Met Arg Leu Gly Glu Pro Thr Ser Asn Glu Thr Leu Ser Cys Val  
 Ile Ile Phe Val Ile Val Tyr Tyr Ala Leu Met Ala Gly Val Val Trp Phe Val Val Leu Thr  
 Tyr Ala Trp His Thr Ser Phe Ala Leu Gly Thr Thr Tyr Gln Pro Leu Ser Gly Lys Thr  
 Ser Tyr Phe His Leu Leu Thr Trp Ser Leu Pro Phe Val Leu Thr Val Ala Ile Leu Ala Val  
 Ala Gln Val Asp Gly Asp Ser Val Ser Gly Ile Cys Phe Val Gly Tyr Lys Asn Tyr Arg Tyr  
 Arg Ala Gly Phe Val Leu Ala Pro Ile Gly Leu Val Leu Ile Val Gly Gly Tyr Phe Leu Ile  
 Arg Gly Val Met Thr Leu Phe Ser Ile Lys Ser Asn His Pro Gly Leu Leu Ser Glu Lys Ala  
 Ala Ser Lys Ile Asn Glu Thr Met Leu Arg Leu Gly Ile Phe Gly Phe Leu Ala Phe Gly Phe  
 Val Leu Ile Thr Phe Ser Cys His Phe Tyr Asp Phe Phe Asn Gln Ala Glu Trp Glu Arg Ser  
 Phe Arg Asp Tyr Val Leu Cys Gln Ala Asn Val Thr Ile Gly Leu Pro Thr Lys Gln Pro Ile  
 Pro Asp Cys Glu Ile Lys Asn Arg Pro Ser Leu Leu Val Glu Lys Ile Asn Leu Phe Ala Met  
 Phe Gly Thr Gly Ile Ala Met Ser Thr Trp Val Trp Thr Lys Ala Thr Leu Leu Ile Trp Arg  
 Arg Thr Trp Cys Arg Leu Thr Gly Gln Ser Asp Asp Glu Pro Lys Arg Ile Lys Lys Ser Lys  
 Met Ile Ala Lys Ala Phe Ser Lys Arg His Glu Leu Leu Gln Asn Pro Gly Gln Glu Leu Ser  
 Phe Ser Met His Thr Val Ser His Asp Gly Pro Val Ala Gly Leu Ala Phe Asp Leu Asn Glu  
 Pro Ser Ala Asp Val Ser Ser Ala Trp Ala Gln His Val Thr Lys Met Val Ala Arg Arg Gly  
 Ala Ile Leu Pro Gln Asp Ile Ser Val Thr Pro Val Ala Thr Pro Val Pro Pro Glu Glu Gln  
 Ala Asn Leu Trp Leu Val Glu Ala Glu Ile Ser Pro Glu Leu Gln Lys Arg Leu Gly Arg Lys  
 Lys Lys Arg Arg Lys Lys Glu Val Cys Pro Leu Ala Pro Pro Pro Glu Leu His Pro  
 Pro Ala Pro Ala Pro Ser Thr Ile Pro Arg Leu Pro Gln Leu Pro Arg Gln Lys Cys Leu Val  
 Ala Ala Gly Ala Trp Gly Ala Gly Asp Ser Cys Arg Gln Gly Ala Trp Thr Leu Val Ser Asn  
 Pro Phe Cys Pro Glu Pro Ser Pro Pro Gln Asp Pro Phe Leu Pro Ser Ala Pro Ala Pro Val

【配列表 1 - 2】

【0 4 8 2】

Ala Trp Ala His Gly Arg Arg Gln Gly Leu Gly Pro Ile His Ser Arg Thr Asn Leu Met Asp  
 Thr Glu Leu Met Asp Ala Asp Ser Asp Phe

配列番号 2 - - S M O のアミノ酸位置 2 8 1 で突然変異を有するヒトスマースンドアミノ

10

20

30

40

50

## 酸配列

## 【配列表 2 - 1】

## 【0 4 8 3】

Met Ala Ala Ala Arg Pro Ala Arg Gly Pro Glu Leu Pro Leu Leu Gly Leu Leu Leu  
 Leu Leu Gly Asp Pro Gly Arg Gly Ala Ala Ser Ser Gly Asn Ala Thr Gly Pro Gly Pro Arg  
 Ser Ala Gly Gly Ser Ala Arg Arg Ser Ala Ala Val Thr Gly Pro Pro Pro Pro Leu Ser His  
 Cys Gly Arg Ala Ala Pro Cys Glu Pro Leu Arg Tyr Asn Val Cys Leu Gly Ser Val Leu Pro  
 Tyr Gly Ala Thr Ser Thr Leu Leu Ala Gly Asp Ser Asp Ser Gln Glu Glu Ala His Gly Lys  
 Leu Val Leu Trp Ser Gly Leu Arg Asn Ala Pro Arg Cys Trp Ala Val Ile Gln Pro Leu Leu  
 Cys Ala Val Tyr Met Pro Lys Cys Glu Asn Asp Arg Val Glu Leu Pro Ser Arg Thr Leu Cys  
 Gln Ala Thr Arg Gly Pro Cys Ala Ile Val Glu Arg Glu Arg Gly Trp Pro Asp Phe Leu Arg  
 Cys Thr Pro Asp Arg Phe Pro Glu Gly Cys Thr Asn Glu Val Gln Asn Ile Lys Phe Asn Ser  
 Ser Gly Gln Cys Glu Val Pro Leu Val Arg Thr Asp Asn Pro Lys Ser Trp Tyr Glu Asp Val  
 Glu Gly Cys Gly Ile Gln Cys Gln Asn Pro Leu Phe Thr Glu Ala Glu His Gln Asp Met His  
 Ser Tyr Ile Ala Ala Phe Gly Ala Val Thr Gly Leu Cys Thr Leu Phe Thr Leu Ala Thr Phe  
 Val Ala Asp Trp Arg Asn Ser Asn Arg Tyr Pro Ala Val Ile Leu Phe Tyr Val Asn Ala Cys  
 Phe Phe Val Gly Ser Ile Gly Xaa Leu Ala Gln Phe Met Asp Gly Ala Arg Arg Glu Ile Val  
 Cys Arg Ala Asp Gly Thr Met Arg Leu Gly Glu Pro Thr Ser Asn Glu Thr Leu Ser Cys Val  
 Ile Ile Phe Val Ile Val Tyr Ala Leu Met Ala Gly Val Val Trp Phe Val Val Leu Thr  
 Tyr Ala Trp His Thr Ser Phe Lys Ala Leu Gly Thr Thr Tyr Gln Pro Leu Ser Gly Lys Thr  
 Ser Tyr Phe His Leu Leu Thr Trp Ser Leu Pro Phe Val Leu Thr Val Ala Ile Leu Ala Val  
 Ala Gln Val Asp Gly Asp Ser Val Ser Gly Ile Cys Phe Val Gly Tyr Lys Asn Tyr Arg Tyr  
 Arg Ala Gly Phe Val Leu Ala Pro Ile Gly Leu Val Ile Val Gly Gly Tyr Phe Leu Ile  
 Arg Gly Val Met Thr Leu Phe Ser Ile Lys Ser Asn His Pro Gly Leu Leu Ser Glu Lys Ala  
 Ala Ser Lys Ile Asn Glu Thr Met Leu Arg Leu Gly Ile Phe Gly Phe Leu Ala Phe Gly Phe  
 Val Leu Ile Thr Phe Ser Cys His Phe Tyr Asp Phe Phe Asn Gln Ala Glu Trp Glu Arg Ser  
 Phe Arg Asp Tyr Val Leu Cys Gln Ala Asn Val Thr Ile Gly Leu Pro Thr Lys Gln Pro Ile  
 Pro Asp Cys Glu Ile Lys Asn Arg Pro Ser Leu Leu Val Glu Lys Ile Asn Leu Phe Ala Met  
 Phe Gly Thr Gly Ile Ala Met Ser Thr Trp Val Trp Thr Lys Ala Thr Leu Leu Ile Trp Arg  
 Arg Thr Trp Cys Arg Leu Thr Gly Gln Ser Asp Asp Glu Pro Lys Arg Ile Lys Lys Ser Lys  
 Met Ile Ala Lys Ala Phe Ser Lys Arg His Glu Leu Leu Gln Asn Pro Gly Gln Glu Leu Ser  
 Phe Ser Met His Thr Val Ser His Asp Gly Pro Val Ala Gly Leu Ala Phe Asp Leu Asn Glu  
 Pro Ser Ala Asp Val Ser Ser Ala Trp Ala Gln His Val Thr Lys Met Val Ala Arg Arg Gly

10

20

30

40

## 【配列表 2 - 2】

## 【0 4 8 4】

Ala Ile Leu Pro Gln Asp Ile Ser Val Thr Pro Val Ala Thr Pro Val Pro Pro Glu Glu Gln  
 Ala Asn Leu Trp Leu Val Glu Ala Glu Ile Ser Pro Glu Leu Gln Lys Arg Leu Gly Arg Lys  
 Lys Lys Arg Arg Lys Arg Lys Glu Val Cys Pro Leu Ala Pro Pro Pro Glu Leu His Pro  
 Pro Ala Pro Ala Pro Ser Thr Ile Pro Arg Leu Pro Gln Leu Pro Arg Gln Lys Cys Leu Val  
 Ala Ala Gly Ala Trp Gly Ala Gly Asp Ser Cys Arg Gln Gly Ala Trp Thr Leu Val Ser Asn  
 Pro Phe Cys Pro Glu Pro Ser Pro Pro Gln Asp Pro Phe Leu Pro Ser Ala Pro Ala Pro Val  
 Ala Trp Ala His Gly Arg Arg Gln Gly Leu Gly Pro Ile His Ser Arg Thr Asn Leu Met Asp  
 Thr Glu Leu Met Asp Ala Asp Ser Asp Phe

10

配列番号 3 S M O のアミノ酸位置 4 5 9 で突然変異を有するヒトスマースンドアミノ酸  
 配列

【配列表 3 - 1】

【0 4 8 5】

Met Ala Ala Ala Arg Pro Ala Arg Gly Pro Glu Leu Pro Leu Leu Gly Leu Leu Leu  
 Leu Leu Gly Asp Pro Gly Arg Gly Ala Ala Ser Ser Gly Asn Ala Thr Gly Pro Gly Pro Arg  
 Ser Ala Gly Gly Ser Ala Arg Arg Ser Ala Ala Val Thr Gly Pro Pro Pro Pro Leu Ser His  
 Cys Gly Arg Ala Ala Pro Cys Glu Pro Leu Arg Tyr Asn Val Cys Leu Gly Ser Val Leu Pro  
 Tyr Gly Ala Thr Ser Thr Leu Leu Ala Gly Asp Ser Asp Ser Gln Glu Glu Ala His Gly Lys  
 Leu Val Leu Trp Ser Gly Leu Arg Asn Ala Pro Arg Cys Trp Ala Val Ile Gln Pro Leu Leu  
 Cys Ala Val Tyr Met Pro Lys Cys Glu Asn Asp Arg Val Glu Leu Pro Ser Arg Thr Leu Cys  
 Gln Ala Thr Arg Gly Pro Cys Ala Ile Val Glu Arg Glu Arg Gly Trp Pro Asp Phe Leu Arg  
 Cys Thr Pro Asp Arg Phe Pro Glu Gly Cys Thr Asn Glu Val Gln Asn Ile Lys Phe Asn Ser  
 Ser Gly Gln Cys Glu Val Pro Leu Val Arg Thr Asp Asn Pro Lys Ser Trp Tyr Glu Asp Val  
 Glu Gly Cys Gly Ile Gln Cys Gln Asn Pro Leu Phe Thr Glu Ala Glu His Gln Asp Met His  
 Ser Tyr Ile Ala Ala Phe Gly Ala Val Thr Gly Leu Cys Thr Leu Phe Thr Leu Ala Thr Phe  
 Val Ala Asp Trp Arg Asn Ser Asn Arg Tyr Pro Ala Val Ile Leu Phe Tyr Val Asn Ala Cys  
 Phe Phe Val Gly Ser Ile Gly Trp Leu Ala Gln Phe Met Asp Gly Ala Arg Arg Glu Ile Val  
 Cys Arg Ala Asp Gly Thr Met Arg Leu Gly Glu Pro Thr Ser Asn Glu Thr Leu Ser Cys Val  
 Ile Ile Phe Val Ile Val Tyr Ala Leu Met Ala Gly Val Val Trp Phe Val Val Leu Thr  
 Tyr Ala Trp His Thr Ser Phe Lys Ala Leu Gly Thr Tyr Gln Pro Leu Ser Gly Lys Thr  
 Ser Tyr Phe His Leu Leu Thr Trp Ser Leu Pro Phe Val Leu Thr Val Ala Ile Leu Ala Val  
 Ala Gln Val Asp Gly Asp Ser Val Ser Gly Ile Cys Phe Val Gly Tyr Lys Asn Tyr Arg Tyr  
 Arg Ala Gly Phe Val Leu Ala Pro Ile Gly Leu Val Leu Ile Val Gly Gly Tyr Phe Leu Ile  
 Arg Gly Val Met Thr Leu Phe Ser Ile Lys Ser Asn His Pro Gly Leu Leu Ser Glu Lys Ala  
 Ala Ser Lys Ile Asn Glu Thr Met Leu Arg Leu Gly Ile Phe Gly Phe Leu Xaa Phe Gly Phe  
 Val Leu Ile Thr Phe Ser Cys His Phe Tyr Asp Phe Phe Asn Gln Ala Glu Trp Glu Arg Ser  
 Phe Arg Asp Tyr Val Leu Cys Gln Ala Asn Val Thr Ile Gly Leu Pro Thr Lys Gln Pro Ile

20

30

40

【配列表 3 - 2】

【0 4 8 6】

Pro Asp Cys Glu Ile Lys Asn Arg Pro Ser Leu Leu Val Glu Lys Ile Asn Leu Phe Ala Met  
 Phe Gly Thr Gly Ile Ala Met Ser Thr Trp Val Trp Thr Lys Ala Thr Leu Leu Ile Trp Arg  
 Arg Thr Trp Cys Arg Leu Thr Gly Gln Ser Asp Asp Glu Pro Lys Arg Ile Lys Lys Ser Lys  
 Met Ile Ala Lys Ala Phe Ser Lys Arg His Glu Leu Leu Gln Asn Pro Gly Gln Glu Leu Ser  
 Phe Ser Met His Thr Val Ser His Asp Gly Pro Val Ala Gly Leu Ala Phe Asp Leu Asn Glu  
 Pro Ser Ala Asp Val Ser Ser Ala Trp Ala Gln His Val Thr Lys Met Val Ala Arg Arg Gly  
 Ala Ile Leu Pro Gln Asp Ile Ser Val Thr Pro Val Ala Thr Pro Val Pro Pro Glu Glu Gln  
 Ala Asn Leu Trp Leu Val Glu Ala Glu Ile Ser Pro Glu Leu Gln Lys Arg Leu Gly Arg Lys  
 Lys Lys Arg Arg Lys Glu Val Cys Pro Leu Ala Pro Pro Pro Glu Leu His Pro  
 Pro Ala Pro Ala Pro Ser Thr Ile Pro Arg Leu Pro Gln Leu Pro Arg Gln Lys Cys Leu Val  
 Ala Ala Gly Ala Trp Gly Ala Gly Asp Ser Cys Arg Gln Gly Ala Trp Thr Leu Val Ser Asn  
 Pro Phe Cys Pro Glu Pro Ser Pro Pro Gln Asp Pro Phe Leu Pro Ser Ala Pro Ala Pro Val  
 Ala Trp Ala His Gly Arg Arg Gln Gly Leu Gly Pro Ile His Ser Arg Thr Asn Leu Met Asp  
 Thr Glu Leu Met Asp Ala Asp Ser Asp Phe

配列番号 4 S M O のアミノ酸位置 5 3 5 で突然変異を有するヒトスマースンドアミノ酸  
 配列

10

20

30

40

【配列表 4 - 1】

【0 4 8 7】

Met Ala Ala Ala Arg Pro Ala Arg Gly Pro Glu Leu Pro Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu  
 Leu Leu Gly Asp Pro Gly Arg Gly Ala Ala Ser Ser Gly Asn Ala Thr Gly Pro Gly Pro Arg  
 Ser Ala Gly Gly Ser Ala Arg Arg Ser Ala Ala Val Thr Gly Pro Pro Pro Leu Ser His  
 Cys Gly Arg Ala Ala Pro Cys Glu Pro Leu Arg Tyr Asn Val Cys Leu Gly Ser Val Leu Pro  
 Tyr Gly Ala Thr Ser Thr Leu Leu Ala Gly Asp Ser Asp Ser Gln Glu Glu Ala His Gly Lys  
 Leu Val Leu Trp Ser Gly Leu Arg Asn Ala Pro Arg Cys Trp Ala Val Ile Gln Pro Leu Leu  
 Cys Ala Val Tyr Met Pro Lys Cys Glu Asn Asp Arg Val Glu Leu Pro Ser Arg Thr Leu Cys  
 Gln Ala Thr Arg Gly Pro Cys Ala Ile Val Glu Arg Glu Arg Gly Trp Pro Asp Phe Leu Arg  
 Cys Thr Pro Asp Arg Phe Pro Glu Gly Cys Thr Asn Glu Val Gln Asn Ile Lys Phe Asn Ser  
 Ser Gly Gln Cys Glu Val Pro Leu Val Arg Thr Asp Asn Pro Lys Ser Trp Tyr Glu Asp Val  
 Glu Gly Cys Gly Ile Gln Cys Gln Asn Pro Leu Phe Thr Glu Ala Glu His Gln Asp Met His  
 Ser Tyr Ile Ala Ala Phe Gly Ala Val Thr Gly Leu Cys Thr Leu Phe Thr Leu Ala Thr Phe  
 Val Ala Asp Trp Arg Asn Ser Asn Arg Tyr Pro Ala Val Ile Leu Phe Tyr Val Asn Ala Cys  
 Phe Phe Val Gly Ser Ile Gly Trp Leu Ala Gln Phe Met Asp Gly Ala Arg Arg Glu Ile Val  
 Cys Arg Ala Asp Gly Thr Met Arg Leu Gly Glu Pro Thr Ser Asn Glu Thr Leu Ser Cys Val  
 Ile Ile Phe Val Ile Val Tyr Tyr Ala Leu Met Ala Gly Val Val Trp Phe Val Val Leu Thr  
 Tyr Ala Trp His Thr Ser Phe Lys Ala Leu Gly Thr Thr Tyr Gln Pro Leu Ser Gly Lys Thr  
 Ser Tyr Phe His Leu Leu Thr Trp Ser Leu Pro Phe Val Leu Thr Val Ala Ile Leu Ala Val

【配列表 4 - 2】

【0 4 8 8】

Ala Gln Val Asp Gly Asp Ser Val Ser Gly Ile Cys Phe Val Gly Tyr Lys Asn Tyr Arg Tyr Arg Ala Gly Phe Val Leu Ala Pro Ile Gly Leu Val Leu Ile Val Gly Gly Tyr Phe Leu Ile Arg Gly Val Met Thr Leu Phe Ser Ile Lys Ser Asn His Pro Gly Leu Leu Ser Glu Lys Ala Ala Ser Lys Ile Asn Glu Thr Met Leu Arg Leu Gly Ile Phe Gly Phe Leu Ala Phe Gly Phe Val Leu Ile Thr Phe Ser Cys His Phe Tyr Asp Phe Asn Gln Ala Glu Trp Glu Arg Ser Phe Arg Asp Tyr Val Leu Cys Gln Ala Asn Val Thr Ile Gly Leu Pro Thr Lys Gln Pro Ile Pro Asp Cys Glu Ile Lys Asn Arg Pro Ser Leu Leu Val Glu Lys Ile Asn Leu Phe Ala Met Phe Gly Thr Gly Ile Ala Met Ser Thr Xaa Val Trp Thr Lys Ala Thr Leu Leu Ile Trp Arg Arg Thr Trp Cys Arg Leu Thr Gly Gln Ser Asp Asp Glu Pro Lys Arg Ile Lys Lys Ser Lys Met Ile Ala Lys Ala Phe Ser Lys Arg His Glu Leu Leu Gln Asn Pro Gly Gln Glu Leu Ser Phe Ser Met His Thr Val Ser His Asp Gly Pro Val Ala Gly Leu Ala Phe Asp Leu Asn Glu Pro Ser Ala Asp Val Ser Ser Ala Trp Ala Gln His Val Thr Lys Met Val Ala Arg Arg Gly Ala Ile Leu Pro Gln Asp Ile Ser Val Thr Pro Val Ala Thr Pro Val Pro Glu Glu Gln Ala Asn Leu Trp Leu Val Glu Ala Glu Ile Ser Pro Glu Leu Gln Lys Arg Leu Gly Arg Lys Lys Lys Arg Arg Lys Lys Glu Val Cys Pro Leu Ala Pro Pro Pro Glu Leu His Pro Pro Ala Pro Ala Pro Ser Thr Ile Pro Arg Leu Pro Gln Leu Pro Arg Gln Lys Cys Leu Val Ala Ala Gly Ala Trp Gly Ala Gly Asp Ser Cys Arg Gln Gly Ala Trp Thr Leu Val Ser Asn Pro Phe Cys Pro Glu Pro Ser Pro Pro Gln Asp Pro Phe Leu Pro Ser Ala Pro Ala Pro Val Ala Trp Ala His Gly Arg Arg Gln Gly Leu Gly Pro Ile His Ser Arg Thr Asn Leu Met Asp Thr Glu Leu Met Asp Ala Asp Ser Asp Phe

10

20

30

40

配列番号 5 ( W T S M O )

【配列表 5 - 1】

【0 4 8 9】

atggcccgctg cccgeccaggc gggggggccg gagetccccgc tccctggggct gctgtgtgtc ctgtgtgtgg  
 gggacccggg cggggggggcg gctctgagcg gaaegegac cggcctggg ctcggagcg cggggggag  
 cgcgaggagg agcgcggggc tgactggccc tccggcggc ctgagccact gggccggc tgcggcc  
 gagccgctgc getacaacgt gtgcctggc tgggtgtgc ctaacgggc cacctccaca ctgtgtggcg  
 gagactcgga ctcccaggag gaagcgcacg gcaagctgtg getctggcgt ggcctccgga atgcggcc  
 ctgtgtggca gtgtatccgc ccctgtgtg tggcgatatac atgcggcaatgt gtgagaatga cgggtggag  
 ctgcggccgc gtaccctctg ccaggccacc cggggccct gtgcgcattgt ggagaggag cggggctggc  
 ctgacttctt ggcgtgcact ctgtggccgt tccctgaagg ctgcacgaat gaggtgcaga acatcaagtt  
 caacagttaa ggcaggatgcg aagtgcctt ggttggaca gacaacccca agagctggta cgaggacgtg  
 gagggtgtcg gcatccagtcc cagaaccccg ctttcacag aggtgtggca ccaggacatg cacagtc  
 tggcgccctt cggggccgtc acggccctt gcaatgtggc acatgtggc ctgactggcg  
 gaaacttgcgtt cgttattttt ctgttgcgtt aatgtgtgt tctttgtggc cagcattggc  
 tggctggccc agtgcgttgc tgggtggccgc cggaggatgt ttcgtgtgc agatggccac atgaggcttgc

【配列表 5 - 2】

【0 4 9 0】

gggagccccac ctcacatgag actctgtctt ggtcatcat cttgtcate gtgtactaag ccctgatggc  
 tgggtgtgtt tgggtgtgg tcctcaccta tgcctggcac acttcctca aagccctggg caccacccat  
 cagccctctt cggcaagac ctcacttca cactgtctca cttggtaact cccctttgtc ctcactgtgg  
 caatccttgc tgtggcgcag gtggatgggg actctgtgag tggcatttgc ttgtggct acaagaacta  
 ecgatacgt ggggcttcg tgcgtcccc aatcgccctg gtgcatecg tggaggctt cttcttcatc  
 cgaggagtca tgactctgtt ctcacatcaag agcaaccacc cgggctgtt gaggatgagaag gtcggcagca  
 agatcaaega gaccatgtt cgcctggca ttttggctt cttggcctt ggtttgtgc tcattaccc  
 cagctgcac ttcacgact tttcaacca ggttggatgg gagegcagct tcgggacta tgtgtatgt  
 caggccaaatg tgaccatcg gtcgtcccc aagcagcccc tccctgaactg tgagatcaag aatcgcccc  
 gcttctgtt ggagaagatc aacctgttg ccatgtttgg aactggcata gccatgagca cctggctcg  
 gaccaaggcc acgetgtca tctggaggg tacctggtgc aggttgcactg ggcagagtga cgttgcagca  
 aagcggatca agaagagcaa gatgattgcc aagcccttct ctaagggca cgcgttgc cagaacc  
 gcccaggatc gtccttcagc atgcacactg tgcctcacga cggcccggt ggggtttgg ctttgcact  
 caatgagcccc tcaactgtatg ttcctctgc ctggcccccag catgtcacca agatggtggc tggagagga  
 gccatactgc cccaggatat ttctgtcacc cttgtggcaa cttcactgtcc cccagaggaa caagccaaacc  
 tgtggctgtt tgaggcagag atctccccag agtgcagaa ggcgtggc cggagaaga agaggaggaa  
 gaggaagaag gaggtgtgcc cgcgtggcc gccccctgag ctccaccccc ctgccttcgc cccaggtacc  
 attcctcgac tgcgttgc gccccggcag aaatgcctgg tggcgtgcagg tgcctggga gtcgggact  
 cttggccaca gggagcgtgg accctggctt ccaaccatt ctgcctcagag cccagtcacc ctcaggatcc  
 atttctgcacc agtgcacccgg ccccccgtggc atgggtcat ggcggccgac agggcctggg gtcattac  
 tccgcacca acctgtatggc cacagaaactc atggatgcag actggactt ctga

配列番号 6 - - S M O のアミノ酸位置 2 4 1 で突然変異を有するヒトスマースンドアミノ酸配列

30

【配列表 6 - 1】

【0 4 9 1】

Met Ala Ala Ala Arg Pro Ala Arg Gly Pro Glu Leu Pro Leu Leu Gly Leu Leu Leu  
 Leu Leu Gly Asp Pro Gly Arg Gly Ala Ala Ser Ser Gly Asn Ala Thr Gly Pro Gly Pro Arg  
 Ser Ala Gly Gly Ser Ala Arg Arg Ser Ala Ala Val Thr Gly Pro Pro Pro Pro Leu Ser His  
 Cys Gly Arg Ala Ala Pro Cys Glu Pro Leu Arg Tyr Asn Val Cys Leu Gly Ser Val Leu Pro  
 Tyr Gly Ala Thr Ser Thr Leu Leu Ala Gly Asp Ser Asp Ser Gln Glu Glu Ala His Gly Lys  
 Leu Val Leu Trp Ser Gly Leu Arg Asn Ala Pro Arg Cys Trp Ala Val Ile Gln Pro Leu Leu  
 Cys Ala Val Tyr Met Pro Lys Cys Glu Asn Asp Arg Val Glu Leu Pro Ser Arg Thr Leu Cys  
 Gln Ala Thr Arg Gly Pro Cys Ala Ile Val Glu Arg Glu Arg Gly Trp Pro Asp Phe Leu Arg  
 Cys Thr Pro Asp Arg Phe Pro Glu Gly Cys Thr Asn Glu Val Gln Asn Ile Lys Phe Asn Ser  
 Ser Gly Gln Cys Glu Val Pro Leu Val Arg Thr Asp Asn Pro Lys Ser Trp Tyr Glu Asp Val  
 Glu Gly Cys Gly Ile Gln Cys Gln Asn Pro Leu Phe Thr Glu Ala Glu His Gln Asp Met His

40

【配列表 6 - 2】

【0 4 9 2】

Ser Tyr Ile Ala Ala Phe Gly Ala Val Xaa Gly Leu Cys Thr Leu Phe Thr Leu Ala Thr Phe  
 Val Ala Asp Trp Arg Asn Ser Asn Arg Tyr Pro Ala Val Ile Leu Phe Tyr Val Asn Ala Cys  
 Phe Phe Val Gly Ser Ile Gly Trp Leu Ala Gln Phe Met Asp Gly Ala Arg Arg Glu Ile Val  
 Cys Arg Ala Asp Gly Thr Met Arg Leu Gly Glu Pro Thr Ser Asn Glu Thr Leu Ser Cys Val  
 Ile Ile Phe Val Ile Val Tyr Tyr Ala Leu Met Ala Gly Val Val Trp Phe Val Val Leu Thr  
 Tyr Ala Trp His Thr Ser Phe Lys Ala Leu Gly Thr Thr Tyr Gln Pro Leu Ser Gly Lys Thr  
 Ser Tyr Phe His Leu Leu Thr Trp Ser Leu Pro Phe Val Leu Thr Val Ala Ile Leu Ala Val  
 Ala Gln Val Asp Gly Asp Ser Val Ser Gly Ile Cys Phe Val Gly Tyr Lys Asn Tyr Arg Tyr  
 Arg Ala Gly Phe Val Leu Ala Pro Ile Gly Leu Val Leu Ile Val Gly Gly Tyr Phe Leu Ile  
 Arg Gly Val Met Thr Leu Phe Ser Ile Lys Ser Asn His Pro Gly Leu Leu Ser Glu Lys Ala  
 Ala Ser Lys Ile Asn Glu Thr Met Leu Arg Leu Gly Ile Phe Gly Phe Leu Ala Phe Gly Phe  
 Val Leu Ile Thr Phe Ser Cys His Phe Tyr Asp Phe Asn Gln Ala Glu Trp Glu Arg Ser  
 Phe Arg Asp Tyr Val Leu Cys Gln Ala Asn Val Thr Ile Gly Leu Pro Thr Lys Gln Pro Ile  
 Pro Asp Cys Glu Ile Lys Asn Arg Pro Ser Leu Leu Val Glu Lys Ile Asn Leu Phe Ala Met  
 Phe Gly Thr Gly Ile Ala Met Ser Thr Trp Val Trp Thr Lys Ala Thr Leu Leu Ile Trp Arg  
 Arg Thr Trp Cys Arg Leu Thr Gly Gln Ser Asp Asp Glu Pro Lys Arg Ile Lys Lys Ser Lys  
 Met Ile Ala Lys Ala Phe Ser Lys Arg His Glu Leu Leu Gln Asn Pro Gly Gln Glu Leu Ser  
 Phe Ser Met His Thr Val Ser His Asp Gly Pro Val Ala Gly Leu Ala Phe Asp Leu Asn Glu  
 Pro Ser Ala Asp Val Ser Ser Ala Trp Ala Gln His Val Thr Lys Met Val Ala Arg Arg Gly  
 Ala Ile Leu Pro Gln Asp Ile Ser Val Thr Pro Val Ala Thr Pro Val Pro Pro Glu Gln  
 Ala Asn Leu Trp Leu Val Glu Ala Glu Ile Ser Pro Glu Leu Gln Lys Arg Leu Gly Arg Lys  
 Lys Lys Arg Arg Lys Lys Glu Val Cys Pro Leu Ala Pro Pro Pro Glu Leu His Pro  
 Pro Ala Pro Ala Pro Ser Thr Ile Pro Arg Leu Pro Gln Leu Pro Arg Gln Lys Cys Leu Val  
 Ala Ala Gly Ala Trp Gly Ala Gly Asp Ser Cys Arg Gln Gly Ala Trp Thr Leu Val Ser Asn  
 Pro Phe Cys Pro Glu Pro Ser Pro Pro Gln Asp Pro Phe Leu Pro Ser Ala Pro Ala Pro Val  
 Ala Trp Ala His Gly Arg Arg Gln Gly Leu Gly Pro Ile His Ser Arg Thr Asn Leu Met Asp  
 Thr Glu Leu Met Asp Ala Asp Ser Asp Phe

配列番号 7 - - S M O のアミノ酸位置 4 0 8 で突然変異を有するヒトスマースンドアミノ酸配列

【配列表 7 - 1】

【0 4 9 3】

Met Ala Ala Ala Arg Pro Ala Arg Gly Pro Glu Leu Pro Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu  
 Leu Leu Gly Asp Pro Gly Arg Gly Ala Ala Ser Ser Gly Asn Ala Thr Gly Pro Gly Pro Arg  
 Ser Ala Gly Gly Ser Ala Arg Arg Ser Ala Ala Val Thr Gly Pro Pro Pro Leu Ser His  
 Cys Gly Arg Ala Ala Pro Cys Glu Pro Leu Arg Tyr Asn Val Cys Leu Gly Ser Val Leu Pro  
 Tyr Gly Ala Thr Ser Thr Leu Leu Ala Gly Asp Ser Asp Ser Gln Glu Glu Ala His Gly Lys

【配列表 7 - 2】

【0 4 9 4】

10

20

30

40

Leu Val Leu Trp Ser Gly Leu Arg Asn Ala Pro Arg Cys Trp Ala Val Ile Gln Pro Leu Leu  
 Cys Ala Val Tyr Met Pro Lys Cys Glu Asn Asp Arg Val Glu Leu Pro Ser Arg Thr Leu Cys  
 Gln Ala Thr Arg Gly Pro Cys Ala Ile Val Glu Arg Glu Arg Gly Trp Pro Asp Phe Leu Arg  
 Cys Thr Pro Asp Arg Phe Pro Glu Gly Cys Thr Asn Glu Val Gln Asn Ile Lys Phe Asn Ser  
 Ser Gly Gln Cys Glu Val Pro Leu Val Arg Thr Asp Asn Pro Lys Ser Trp Tyr Glu Asp Val  
 Glu Gly Cys Gly Ile Gln Cys Gln Asn Pro Leu Phe Thr Glu Ala Glu His Gln Asp Met His  
 Ser Tyr Ile Ala Ala Phe Gly Ala Val Thr Gly Leu Cys Thr Leu Phe Thr Leu Ala Thr Phe  
 Val Ala Asp Trp Arg Asn Ser Asn Arg Tyr Pro Ala Val Ile Leu Phe Tyr Val Asn Ala Cys  
 Phe Phe Val Gly Ser Ile Gly Trp Leu Ala Gln Phe Met Asp Gly Ala Arg Arg Glu Ile Val  
 Cys Arg Ala Asp Gly Thr Met Arg Leu Gly Glu Pro Thr Ser Asn Glu Thr Leu Ser Cys Val  
 Ile Ile Phe Val Ile Val Tyr Tyr Ala Leu Met Ala Gly Val Val Trp Phe Val Val Leu Thr  
 Tyr Ala Trp His Thr Ser Phe Lys Ala Leu Gly Thr Thr Tyr Gln Pro Leu Ser Gly Lys Thr  
 Ser Tyr Phe His Leu Leu Thr Trp Ser Leu Pro Phe Val Leu Thr Val Ala Ile Leu Ala Val  
 Ala Gln Val Asp Gly Asp Ser Val Ser Gly Ile Cys Phe Val Gly Tyr Lys Asn Tyr Arg Tyr  
 Arg Ala Gly Phe Val Leu Ala Pro Xaa Gly Leu Val Ile Val Gly Gly Tyr Phe Leu Ile  
 Arg Gly Val Met Thr Leu Phe Ser Ile Lys Ser Asn His Pro Gly Leu Leu Ser Glu Lys Ala  
 Ala Ser Lys Ile Asn Glu Thr Met Leu Arg Leu Gly Ile Phe Gly Phe Leu Ala Phe Gly Phe  
 Val Leu Ile Thr Phe Ser Cys His Phe Tyr Asp Phe Phe Asn Gln Ala Glu Trp Glu Arg Ser  
 Phe Arg Asp Tyr Val Leu Cys Gln Ala Asn Val Thr Ile Gly Leu Pro Thr Lys Gln Pro Ile  
 Pro Asp Cys Glu Ile Lys Asn Arg Pro Ser Leu Leu Val Glu Lys Ile Asn Leu Phe Ala Met  
 Phe Gly Thr Gly Ile Ala Met Ser Thr Trp Val Trp Thr Lys Ala Thr Leu Leu Ile Trp Arg  
 Arg Thr Trp Cys Arg Leu Thr Gly Gln Ser Asp Asp Glu Pro Lys Arg Ile Lys Lys Ser Lys  
 Met Ile Ala Lys Ala Phe Ser Lys Arg His Glu Leu Leu Gln Asn Pro Gly Gln Glu Leu Ser  
 Phe Ser Met His Thr Val Ser His Asp Gly Pro Val Ala Gly Leu Ala Phe Asp Leu Asn Glu  
 Pro Ser Ala Asp Val Ser Ser Ala Trp Ala Gln His Val Thr Lys Met Val Ala Arg Arg Gly  
 Ala Ile Leu Pro Gln Asp Ile Ser Val Thr Pro Val Ala Thr Pro Val Pro Pro Glu Glu Gln  
 Ala Asn Leu Trp Leu Val Glu Ala Glu Ile Ser Pro Glu Leu Gln Lys Arg Leu Gly Arg Lys  
 Lys Lys Arg Arg Lys Lys Glu Val Cys Pro Leu Ala Pro Pro Glu Leu His Pro  
 Pro Ala Pro Ala Pro Ser Thr Ile Pro Arg Leu Pro Gln Leu Pro Arg Gln Lys Cys Leu Val  
 Ala Ala Gly Ala Trp Gly Ala Gly Asp Ser Cys Arg Gln Gly Ala Trp Thr Leu Val Ser Asn  
 Pro Phe Cys Pro Glu Pro Ser Pro Pro Gln Asp Pro Phe Leu Pro Ser Ala Pro Ala Pro Val  
 Ala Trp Ala His Gly Arg Arg Gln Gly Leu Gly Pro Ile His Ser Arg Thr Asn Leu Met Asp  
 Thr Glu Leu Met Asp Ala Asp Ser Asp Phe

配列番号 8 - - S M O のアミノ酸位置 4 6 9 で突然変異を有するヒトスマースンドアミノ酸配列

【配列表 8 - 1】

【0 4 9 5】

10

20

30

40

Met Ala Ala Ala Arg Pro Ala Arg Gly Pro Glu Leu Pro Leu Leu Gly Leu Leu Leu  
 Leu Leu Gly Asp Pro Gly Arg Gly Ala Ala Ser Ser Gly Asn Ala Thr Gly Pro Gly Pro Arg  
 Ser Ala Gly Gly Ser Ala Arg Arg Ser Ala Ala Val Thr Gly Pro Pro Pro Pro Leu Ser His  
 Cys Gly Arg Ala Ala Pro Cys Glu Pro Leu Arg Tyr Asn Val Cys Leu Gly Ser Val Leu Pro  
 Tyr Gly Ala Thr Ser Thr Leu Leu Ala Gly Asp Ser Asp Ser Gln Glu Glu Ala His Gly Lys  
 Leu Val Leu Trp Ser Gly Leu Arg Asn Ala Pro Arg Cys Trp Ala Val Ile Gln Pro Leu Leu  
 Cys Ala Val Tyr Met Pro Lys Cys Glu Asn Asp Arg Val Glu Leu Pro Ser Arg Thr Leu Cys  
 Gln Ala Thr Arg Gly Pro Cys Ala Ile Val Glu Arg Gly Trp Pro Asp Phe Leu Arg  
 Cys Thr Pro Asp Arg Phe Pro Glu Gly Cys Thr Asn Glu Val Gln Asn Ile Lys Phe Asn Ser  
 Ser Gly Gln Cys Glu Val Pro Leu Val Arg Thr Asp Asn Pro Lys Ser Trp Tyr Glu Asp Val  
 Glu Gly Cys Gly Ile Gln Cys Gln Asn Pro Leu Phe Thr Glu Ala Glu His Gln Asp Met His  
 Ser Tyr Ile Ala Ala Phe Gly Ala Val Thr Gly Leu Cys Thr Leu Phe Thr Leu Ala Thr Phe  
 Val Ala Asp Trp Arg Asn Ser Asn Arg Tyr Pro Ala Val Ile Leu Phe Tyr Val Asn Ala Cys  
 Phe Phe Val Gly Ser Ile Gly Trp Leu Ala Gln Phe Met Asp Gly Ala Arg Arg Glu Ile Val  
 Cys Arg Ala Asp Gly Thr Met Arg Leu Gly Glu Pro Thr Ser Asn Glu Thr Leu Ser Cys Val  
 Ile Ile Phe Val Ile Val Tyr Tyr Ala Leu Met Ala Gly Val Val Trp Phe Val Val Leu Thr  
 Tyr Ala Trp His Thr Ser Phe Lys Ala Leu Gly Thr Thr Tyr Gln Pro Leu Ser Gly Lys Thr  
 Ser Tyr Phe His Leu Leu Thr Trp Ser Leu Pro Phe Val Leu Thr Val Ala Ile Leu Ala Val  
 Ala Gln Val Asp Gly Asp Ser Val Ser Gly Ile Cys Phe Val Gly Tyr Lys Asn Tyr Arg Tyr  
 Arg Ala Gly Phe Val Leu Ala Pro Ile Gly Leu Val Ile Val Gly Glu Tyr Phe Leu Ile  
 Arg Gly Val Met Thr Leu Phe Ser Ile Lys Ser Asn His Pro Gly Leu Leu Ser Glu Lys Ala  
 Ala Ser Lys Ile Asn Glu Thr Met Leu Arg Leu Gly Ile Phe Gly Phe Leu Ala Phe Gly Phe  
 Val Leu Ile Thr Phe Ser Xaa His Phe Tyr Asp Phe Phe Asn Gln Ala Glu Trp Glu Arg Ser  
 Phe Arg Asp Tyr Val Leu Cys Gln Ala Asn Val Thr Ile Gly Leu Pro Thr Lys Gln Pro Ile  
 Pro Asp Cys Glu Ile Lys Asn Arg Pro Ser Leu Leu Val Glu Lys Ile Asn Leu Phe Ala Met  
 Phe Gly Thr Gly Ile Ala Met Ser Thr Trp Val Trp Thr Lys Ala Thr Leu Leu Ile Trp Arg  
 Arg Thr Trp Cys Arg Leu Thr Gly Gln Ser Asp Asp Glu Pro Lys Arg Ile Lys Lys Ser Lys  
 Met Ile Ala Lys Ala Phe Ser Lys Arg His Glu Leu Leu Gln Asn Pro Gly Gln Glu Leu Ser  
 Phe Ser Met His Thr Val Ser His Asp Gly Pro Val Ala Gly Leu Ala Phe Asp Leu Asn Glu  
 Pro Ser Ala Asp Val Ser Ser Ala Trp Ala Gln His Val Thr Lys Met Val Ala Arg Arg Gly  
 Ala Ile Leu Pro Gln Asp Ile Ser Val Thr Pro Val Ala Thr Pro Val Pro Glu Glu Gln  
 Ala Asn Leu Trp Leu Val Glu Ala Glu Ile Ser Pro Glu Leu Gln Lys Arg Leu Gly Arg Lys  
 Lys Lys Arg Arg Lys Lys Glu Val Cys Pro Leu Ala Pro Pro Pro Glu Leu His Pro  
 Pro Ala Pro Ala Pro Ser Thr Ile Pro Arg Leu Pro Gln Leu Pro Arg Gln Lys Cys Leu Val  
 Ala Ala Gly Ala Trp Gly Ala Gly Asp Ser Cys Arg Gln Gly Ala Trp Thr Leu Val Ser Asn

## 【配列表 8 - 2】

## 【0 4 9 6】

Pro Phe Cys Pro Glu Pro Ser Pro Pro Gln Asp Pro Phe Leu Pro Ser Ala Pro Ala Pro Val  
 Ala Trp Ala His Gly Arg Arg Gln Gly Leu Gly Pro Ile His Ser Arg Thr Asn Leu Met Asp  
 Thr Glu Leu Met Asp Ala Asp Ser Asp Phe

配列番号 9 - - S M O のアミノ酸位置 5 3 3 で突然変異を有するヒトスマースンドアミノ

10

20

30

40

50

## 酸配列

## 【配列表 9 - 1】

## 【0 4 9 7】

Met Ala Ala Ala Arg Pro Ala Arg Gly Pro Glu Leu Pro Leu Leu Gly Leu Leu Leu  
 Leu Leu Gly Asp Pro Gly Arg Gly Ala Ala Ser Ser Gly Asn Ala Thr Gly Pro Gly Pro Arg  
 Ser Ala Gly Gly Ser Ala Arg Arg Ser Ala Ala Val Thr Gly Pro Pro Pro Pro Leu Ser His  
 Cys Gly Arg Ala Ala Pro Cys Glu Pro Leu Arg Tyr Asn Val Cys Leu Gly Ser Val Leu Pro  
 Tyr Gly Ala Thr Ser Thr Leu Leu Ala Gly Asp Ser Asp Ser Gln Glu Glu Ala His Gly Lys  
 Leu Val Leu Trp Ser Gly Leu Arg Asn Ala Pro Arg Cys Trp Ala Val Ile Gln Pro Leu Leu  
 Cys Ala Val Tyr Met Pro Lys Cys Glu Asn Asp Arg Val Glu Leu Pro Ser Arg Thr Leu Cys  
 Gln Ala Thr Arg Gly Pro Cys Ala Ile Val Glu Arg Glu Arg Gly Trp Pro Asp Phe Leu Arg  
 Cys Thr Pro Asp Arg Phe Pro Glu Gly Cys Thr Asn Glu Val Gln Asn Ile Lys Phe Asn Ser  
 Ser Gly Gln Cys Glu Val Pro Leu Val Arg Thr Asp Asn Pro Lys Ser Trp Tyr Glu Asp Val  
 Glu Gly Cys Gly Ile Gln Cys Gln Asn Pro Leu Phe Thr Glu Ala Glu His Gln Asp Met His  
 Ser Tyr Ile Ala Ala Phe Gly Ala Val Thr Gly Leu Cys Thr Leu Phe Thr Leu Ala Thr Phe  
 Val Ala Asp Trp Arg Asn Ser Asn Arg Tyr Pro Ala Val Ile Leu Phe Tyr Val Asn Ala Cys  
 Phe Phe Val Gly Ser Ile Gly Trp Leu Ala Gln Phe Met Asp Gly Ala Arg Arg Glu Ile Val  
 Cys Arg Ala Asp Gly Thr Met Arg Leu Gly Glu Pro Thr Ser Asn Glu Thr Leu Ser Cys Val  
 Ile Ile Phe Val Ile Val Tyr Tyr Ala Leu Met Ala Gly Val Val Trp Phe Val Val Leu Thr  
 Tyr Ala Trp His Thr Ser Phe Lys Ala Leu Gly Thr Thr Tyr Gln Pro Leu Ser Gly Lys Thr  
 Ser Tyr Phe His Leu Leu Thr Trp Ser Leu Pro Phe Val Leu Thr Val Ala Ile Leu Ala Val  
 Ala Gln Val Asp Gly Asp Ser Val Ser Gly Ile Cys Phe Val Gly Tyr Lys Asn Tyr Arg Tyr  
 Arg Ala Gly Phe Val Leu Ala Pro Ile Gly Leu Val Leu Ile Val Gly Tyr Phe Leu Ile  
 Arg Gly Val Met Thr Leu Phe Ser Ile Lys Ser Asn His Pro Gly Leu Leu Ser Glu Lys Ala  
 Ala Ser Lys Ile Asn Glu Thr Met Leu Arg Leu Gly Ile Phe Gly Phe Leu Ala Phe Gly Phe  
 Val Leu Ile Thr Phe Ser Cys His Phe Tyr Asp Phe Phe Asn Gln Ala Glu Trp Glu Arg Ser  
 Phe Arg Asp Tyr Val Leu Cys Gln Ala Asn Val Thr Ile Gly Leu Pro Thr Lys Gln Pro Ile  
 Pro Asp Cys Glu Ile Lys Asn Arg Pro Ser Leu Leu Val Glu Lys Ile Asn Leu Phe Ala Met  
 Phe Gly Thr Gly Ile Ala Met Xaa Thr Trp Val Trp Thr Lys Ala Thr Leu Leu Ile Trp Arg  
 Arg Thr Trp Cys Arg Leu Thr Gly Gln Ser Asp Asp Glu Pro Lys Arg Ile Lys Lys Ser Lys  
 Met Ile Ala Lys Ala Phe Ser Lys Arg His Glu Leu Leu Gln Asn Pro Gly Gln Glu Leu Ser  
 Phe Ser Met His Thr Val Ser His Asp Gly Pro Val Ala Gly Leu Ala Phe Asp Leu Asn Glu

## 【配列表 9 - 2】

## 【0 4 9 8】

10

20

30

40

Pro Ser Ala Asp Val Ser Ser Ala Trp Ala Gln His Val Thr Lys Met Val Ala Arg Arg Gly  
 Ala Ile Leu Pro Gln Asp Ile Ser Val Thr Pro Val Ala Thr Pro Val Pro Glu Glu Gln  
 Ala Asn Leu Trp Leu Val Glu Ala Glu Ile Ser Pro Glu Leu Gln Lys Arg Leu Gly Arg Lys  
 Lys Lys Arg Arg Lys Arg Lys Glu Val Cys Pro Leu Ala Pro Pro Pro Glu Leu His Pro  
 Pro Ala Pro Ala Pro Ser Thr Ile Pro Arg Leu Pro Gln Leu Pro Arg Gln Lys Cys Leu Val  
 Ala Ala Gly Ala Trp Gly Ala Gly Asp Ser Cys Arg Gln Gly Ala Trp Thr Leu Val Ser Asn  
 Pro Phe Cys Pro Glu Pro Ser Pro Pro Gln Asp Pro Phe Leu Pro Ser Ala Pro Ala Pro Val  
 Ala Trp Ala His Gly Arg Arg Gln Gly Leu Gly Pro Ile His Ser Arg Thr Asn Leu Met Asp  
 Thr Glu Leu Met Asp Ala Asp Ser Asp Phe

10

配列番号 10 - 融合 (S u F u) アミノ酸配列のヒトサブレッサー (GenBank 受  
 託番号 NM\_016169.2)

【配列表 10】

【0499】

MAELRPSPGAPGPTAPPAPGPTAPPASLFPPLHAIYGECCRRLYPDQPNPLQVTAIVKYWLGGPDPLDYVSMYRNVGSPS  
 AN1PEHWHY1SFGLSDLYGDNRVHEFTGTDGPSGFGFELTFRLKRETGESAPPTWPAELMQGLARYVFQSENTFCSGDIHS  
 WHISPLDNSESRIQHMLLTDPPQMQPVQTIPFGVVTFLQIVGVCTEELHSQQWNGQGILELLRTVP1AGGPWL1TDMRRGET  
 IFEIDPHLQERVDKG1ETDGSNLGVSACKAWDDLSRPPEDDEDSS1C1GTQPRRLSGKDTEQ1RETLLRGLE1NSKPVL  
 PP1NPQRQNGLAHDRAKDSLESSTAI1PHEL1RTRQLESVHLKFNQESGAL1PLCLRGRL1IHRHIFTYKS1TGDMA  
 1TFVSTGVVEGAFATEEHPYAAHGPWLQ1LLTEEFVEMLEDLEDLSPEEFKLPEYSWPEKKLKVS1LPDVVFDSPLH

20

配列番号 11 - 融合 (S u F u) cDNA 配列のヒトサブレッサー (GenBank 受  
 託番号 NM\_016169.2)

【配列表 11 - 1】

【0500】

CGCCGTGCGCAGGCCGCGGAGCTAGACCTCGCTGCAGCCCCATGCCCTGGGGAGTCTCACCCACCGAGTCCGCCGCTGG  
 CCCGTCACTGCTCTCCCGCTGTTGCCCTCTCCAGTTCCAGTGCCTGCCCTACGCACCCGATGGCGGAGCTGCC  
 CTAGCGCGCCCCCGGCCACCGCGCCCCCGGCCACTGCCCTGGCCACTGCCCTGGCCCTTCGCTTCGCTCTTCCCCGG  
 GACTGCCACGCCATCTACGGAGAGTGCCGCGCTTACCTGACCAAGCCGCTCCAGGTACCGCTATCGTCAAGT  
 ACTGGTTGGGTGGCCAGACCCCTGGACTATGTTAGCATGTACAGGAATGTGGGGAGCCCTCTGCTAACATCCCCGAGC  
 ACTGGCACTACATCAGCTTCCGCTGAGTGATCTATGGTGACAACAGAGTCCATGAGTTACAGGAACAGATGGACCTA  
 GTGGTTTGGCTTGAGTTGACCTTCGCTGAAGAGAGAACTGGGGAGTCTGCCCAACCATGGCCCGAGAGTTAA  
 TGCAGGGCTGGCACGATACTGTTCCAGTCAGAGAACACCTCTGCAGTGGGACCATGTCCTGGCACAGCCCTTGG  
 ATAACAGTGAGTCAGAAATTCAAGCACATGCTGCTGACAGAGGACCCACAGATGCAGCCGTGCAGACACCCCTTGG  
 TTACCTTCCAGATCGTGGTGTCTGCACTGAAGAGCTACACTCAGCCCAGCAGTGGAACGGCAGGGCATCCTGGAGC  
 TGCTGCCAGACTGCTATTGCTGGCGCCCTGGCTGATAACTGACATGCCAGGGAGAGACCATATTGAGATCGATC  
 CACACCTGCAAGAGAGAGTTGACAAAGGCATCGAGACAGATGGCTCAACCTGAGTGGTGTCACTGCCAAGTGTGCCTGG  
 ATGACCTGAGCCGGCCCCCGAGGATGACGAGGACAGCCGGACCATCTGCATGCCACACAGCCCCGGACTCTCTGGCA  
 AAGACACAGAGCAGATCCGGAGACCCCTGAGGAGAGGACTCGAGATCAACAGCAAACCTGCTTCCACCAATCAACCC

30

【配列表 11 - 2】

【0501】

40

AGCGCAGAATGGCTCGCCACGACCGGGCCCCGAGCGCAAAGACAGCCTGAAAGTGACAGCTCCACGGCCATCATTC  
 CCCATGAGCTGATTCGCACGGCGAGCTGAGAGCGTACATCTGAAATTCAACCAGGAGTCGGAGCCCTCATTCCTCT  
 GCCTAAGGGCAGGCTCTGCATGGACGGACTTACATATAAAAGTATCACAGGTGACATGGCCATCACGTTGTCTCCA  
 CGGGAGTGGAGGGCGCTTGGCACTGAGGAGCATCCTACGGCTCATGGACCCCTGGTTACAAATTCTGTTGACCGAAG  
 AGTTGTAGAGAAAATGTTGGAGGATTAGAAGATTGACTTCTCCAGAGGAATTCAAACCTCCAAAGAGTACAGCTGGC  
 CTGAAAAGAAGCTGAAGGTCTCCATCCTGCCTGACGTGGTGTGACAGTCCGCTACACTAGCCTGGCTGGCCCTGCAG  
 GGGCCAGCAGGGAGCCAGTGCCTCCCCAGTGAATTCCAGTGTAAACAGTTGTCACAGGAGATCTCCACAAATAAAGGAC  
 AAGTGTGAGGAAGACTGCCAGTGCACCCGCAGGCCAGTGGGTGCCATGCACAGGCCACAGGCCCTCACCTCAC  
 CAGCTCAGGGGCCACCCGCCGCTGGCTAACGCTTGTGACCCATCAGGCCAGTGAAGTGGCAATGCCACCCCTCC  
 CCTGCAGCCTGCACAGATTCTGGTTGAGGTTGACTCTGGACCCCTGGCTGTGCCCTAGGTGGAGACAGCCCTTTCTC  
 ACCTACCCCTGCCGACAGCCCAGCAGGAGGGAGGCGGACAGCCAGATGCAGAGCGAGTGGATGCACTTCCAGCTCATC  
 TCTGGAAGCCTTGTACTCAAGCTCTGGCGCGAACATTCTCTGATCATGTTGGTTTCTCTTCCTTATT  
 ATTTGTAGAAACGGGTGGTATTATTGCTCTGCAAAGATGTCCAGAAGCCATGTATATAATGTTTTAAACAGAACT  
 TCATTCCCCTGAACTTTGCATTCTGACAGAGGCCCTAGGGCTGTATCTCTCCCTGGCTGCCACCAGAGAAGGTGCT  
 TGGTGTGCGCTGCCAGGCCAGAGCCCTGGAGGAGGCCGCTGCACAGAGAGGCTTCTCCAGTGGGCTGATGGAGC  
 CCGGGCAGGGGAGAGTAGAGACACTCCCTGTGCAGCTTGTGAGCTAGTTAGCTGGGCAAGGGAGGGGTGCTACTGT  
 TTTCCAAGTGAATGGGTCTCAAAGACTTGGTGACCCAGCCTCATCTCTAGGCCTTTCCATCCAACCAGGCCTACCTGG  
 GAGAGGGTGAGGTTGAGCACATCACACACCCTCCACTGTCAATTAGGGCTGGCTCCAGCTGTGTAACCAGTCTGT  
 CCCATTCTCAGTCCCTGGGCTCCAGCCTCAGGCTGTAGGGCTGCCCTACTAAAATTGAAAAT  
 CCACCTCTAACATCTCTTCACTTGGTTTGCTAACACTGCTCTGCTGCCCTCCATCTCCCTGTATCCATTCTG  
 CCCTATCTTICATTCTCACTCTAACATCCCTCTCTTCTGGCATCTGGCTCTGTGGCTCTCAGCCCTCACCCAG  
 TACTGCAGATCTCACAGTTGCCCTCCAGAACGCCCTATCTCTAGCCATGGTTGGAGTCTCTGGGTTATCTCC  
 CACGCCCTGACCTGGAACCAGCAAGCCCCTTCTGCCCTTACCCCCACTCTAGGGATGGACTGTTACAATACTCAA  
 GATCACTTTACACCTCTCAAAGCAAAGTCATGACAATGCAGGGCTCTCATTGCTCCATCTGCCCTGCTGCACACA  
 CAGGCACCAAGCAGGGATGCCACAGGAGTGGCCACAGGGTGCAGGACTCCACTGTGAGAGATCCAGCCAAGAGCTGCC  
 CAGGGGTATGAGGGCACCAGCTGGGTCTCCAGGGAGCAGGAGTGGACCTCCATGGAGCCACTAGGCCTGGCTCT  
 CACATCCCCAGGGCTATCTGGTAATTCCATCAAGCTCAGAGTAAAGGCATATCAGCCTGGAGTATTGGAGAGACTG  
 GCTGCAGATCCCCGCCAGCCAAGATGCAAGCCACTGGGACCTGTGTCGGCAGCTGTGCTCTACTGCCCTGAGGACTTA  
 CCAGAGGGAGCCCTACTGGCCTCCCCACACAGCAGCCCTGCCGTGAAGCTTGTGACATTACAGGCAGAG  
 AGGTGCCATCAGTTCGCCTCCATTCTGCCACCATGACCAGCCTCTCCCTGAACCTCTCTGCTCGGACCTGCC  
 GGCTCCCTGCTGCAGTTCGCCCTACTTCCATCTGCTGGGTGCCCTCATCGTTGGTGGGATGGGCTTCTGAG  
 CTAAGCTTGTCAATTGTTGTAAGCACCTGGTCAGCAACCTGCCAGACCTGGAGGGTCTTGTGAGACTGAAGGTAGA  
 CACCAGCCAGCATGGTGGCCCTGTTCTGGGGGAGCAGGGTAAGGCAGGAGGAAGTGGGTGAGCTCGAGATGATGAGCACA  
 TGAAGCTGTGGCCCTTGTACCTGCAATATGTCAGGAGCCTCACGCTCACCAAGATCTGCAGGGCAGGCTCCATC  
 TCACTGGCTCTGAGGGCAGGACAGGGTATCACACATTCTCACAGGCCCTTCTATGGCATTGGTGCCTCCCAGAG

【配列表 1 1 - 3】

【0 5 0 2】

10

20

30

40

TTCTGGCACAGGATGCTTGGTGAATGTACCCCTTCTTCCCTCCCTGCAGCTCTGAGGGAGCCCCTGACCTGTAGTGGGTGGAGGAGGTAAAGGGCTCCCTCCCTAAATCTGCCCTCTGCAAGCTACTTGGAGACTTGCTAGTTGTACCCACCCCTCAGGTCCCTGGTCTAGAGCTTCTGAGAAGGGCTTCCCTTCCCTTGCTGCTATATAAGGCAGGCTCCTGTGGCTCTGCTGGCTCAGTGTGGGCTGCAGGAGGACTGCAGACTCAGCTGCAATTCTGAGGGGGTTGGGAGGCTGTGCGAGGTCTCAGGCCTGTGTGGGAGCTGGTGCCTCTCCTGCCGTATCTTCTCTTCCAAGGGCAGTGCTCCAAGGCAGGGACTGGGAAAGCCAAGGGAGAGTCTAAAGGGCTAGAGCATTAAAGACACAGGGCTTGGGACTGGGTTCGATTGAGTTGCAAGCAGGAGAAAACCTGAAGGTCGGTGCCTATGGGCTGACCAAGTAGAGAAATTCTTACTGTATTGGTGTGCTGGTCTCCCTTCTGGCTCTAGGACATCCATGCCAGGTGAGGTGCCTGGTCCCTGTTACAAGTCAGGAGCCTGTAGGAGACCCCTCTTGTACAAGTACCTGAATGCTGGACAAGCAGATTGTAAATTTATATTAGTTTAATGTCAGTGGCGACTCGGTTCCCTGGGCTGCAGCCAGCCTGGACTTTGTAAAGAATTGGTGACTIONTAGATGTCGTTCTCTTGCAG

10

【 図 1 A 】

配列番号 1 (WT-SMO)

【 図 1 B 】

配列番号2 (SMO-Dna 1の図28-1)の変形異

【 図 1 C 】

配列番号 3 (SMO09a) 位置 4,5,9 位の突然変異

【 図 1 D 】

配列番号4 (aa 位置5-35での突然変異)

【 図 1 E 】

### 配列番号5 (WT-SMO)

【 図 1 F 】

配列番号6 (SMOのa位臓241での突然変異)  
Met Ala Ala Ala Arg Phe Ala Arg Gly Pro Glu Leu Pro Leu Leu Gly Leu Leu Leu  
Leu Leu Leu Gly Asp Pro Gly Arg Gly Ala Ala Ser Ser Gly Asp Ala Thr Gly Pro Gly  
Pro Arg Ser Ala Gly Gly Ser Ala Arg Arg Ser Ala Ala Val Thr Gly Pro Pro Pro Leu  
Leu Ser His Cys Gly Arg Ala Ala Pro Cys Gly Pro Leu Arg Tyr Val Asp Val Cys Leu Gly Ser  
Val Ser His Tyr Gly Ala Thr Ser His Leu Leu Ala Gly Asp Ser Asp Ser Gly Glu His Ala  
His Gly Lys Leu Val Leu Trp Ser Gly Leu Arg Asn Ala Pro Arg Cys Trp Ala Val Ile Gly  
Pro Leu Leu Cys Ala Val Tvr Met Pro Lys Cys Gly Asp Arg Val Leu Leu Pro Ser  
Arg Thr Leu Cys Gly Ala Thr Arg Gly Pro Cys Ala Ile Val Gly Arg Gly Trp Pro  
Asp Phe Leu Arg Cys Thr Pro Asp Arg Phe Pro Gly Gly Cys Thr Asn Gly Val Gly Asn  
Leu Lys Phe Asn Ser Ser Gly Gly Cys Gly Val Pro Leu Val Arg Thr Asp Asp Pro Lys Ser  
Trp Tyr Gly Asp Val Gly Gly Cys Gly Ile Gly Cys Gly Asp Pro Leu Phe Thr Gly  
Glu His Gly Asp Met His Ser Tyr His Ala Phe Gly Ala Val Xaa Gly Leu Cys Thr Leu  
Phe Thr Leu Ala Thr Phe Val Ala Asp Trp Arg Asn Ser Asp Arg Pro Ala Val Ile Leu  
Phe Tyr Val Asn Ala Cys Phe Phe Val Gly Ser Ile Gly Trp Leu Ala Gly Phe Met Asp Gly  
Ala Arg Arg Gly Ile Val Cys Arg Ala Phe Gly Thr Met Arg Leu Gly Glu Pro Thr Ser  
Asn Glu Chl Thr Leu Ser Cys Val Ile Gly Phe Val Ile Val Tyr Ala Leu Met Ala Gly Val  
Val Trp Phe Val Val Leu Thr Tyr Ala Trp His Thr Ser Phe Lys Ala Leu Gly Thr Tyr Val  
Gln Pro Leu Ser Gly Lys Thr Ser Tyr Phe His Leu Leu Thr Trp Ser Leu Pro Phe Val Leu  
Thr Val Ala Ile Leu Ala Val Ala Gln Val Asp Gly Asp Ser Val Ser Gly Ile Cys Phe Val  
Gly Tyr Lys Asn Tyr Arg Ala Gly Phe Val Leu Ala Pro Ile Gly Leu Val Leu Ile  
Val Gly Gly Tyr Phe Leu Ile Arg Gly Val Met Thr Leu Phe Ser Ile Lys Ser Asn His Pro  
Gly Leu Leu Ser Gly Lys Ala Ala Ser Lys Ile Asn Gly Chl Met Leu Arg Leu Gly Ile Gly  
Phe Leu Ala Phe Gly Phe Val Leu Ile Thr Phe Ser Cys His Phe Thr Asp Phe Asn  
Gln Ala Glu Trp Gly Arg Ser Phe Arg Asp Tyr Val Leu Cys Gly Ala Asn Val Thr Ile Gly  
Leu Pro Thr Lys Gly Pro Pro Asp Cys Gly Ile Lys Asn Arg Pro Ser Leu Leu Val Gly  
Lys Ile Asn Leu Phe Ala Met Phe Gly Thr Gly Ile Ala Met Ser Thr Trp Val Trp Thr Lys Leu  
Ala Thr Leu Leu Ile Trp Arg Arg Thr Trp Cys Arg Leu Thr Gly Glu Ser Asp Asp Gly  
Pro Lys Arg His Lys Leu Ser Lys Met Ile Ala Lys Ala Phe Ser Lys Arg His Glu Leu Leu  
Gln Asn Pro Gly Gly Glu Leu Ser Phe Ser Met His Thr Val Ser His Asp Gly Pro Val Ala  
Gly Leu Ala Phe Asp Leu Asn Glu Pro Ser Ala Asp Val Ser Ser Ala Trp Ala Gly His Val  
Thr Lys Met Val Ala Arg Arg Gly Ala Ile Leu Pro Gly Asp Ser Ile Ser Val Thr Val Pro Val Ala  
Thr Pro Val Pro Glu Gly Gly Ile Asn Leu Trp Leu Val Gly Glu Ile Ser Pro Gly  
Leu Gly Lys Arg Leu Gly Arg Lys Lys Arg Arg Lys Arg Lys Gly Val Val Cys Pro  
Leu Ala Pro Pro Pro Glu Leu His Pro Pro Ala Pro Pro Ser Thr Ile Pro Arg Leu Pro  
Gly Leu Pro Arg Gly Lys Cys Leu Val Ile Ala Gly Ile Trp Gly Ala Gly Asp Ser Gly  
Arg Gly Ala Trp Thr Leu Val Ser Asu Pro Phe Cys Pro Glu Pro Ser Pro Pro Gly Asp  
Pro Phe Leu Pro Ser Ala Pro Ala Pro Val Pro Val Ile Phe His Gly Arg Arg Gly Leu Gly  
Pro Ile His Ser Arg Asn Leu Met Asp Thr Glu Leu Met Asp Ala Asn Ser Asp Phe

【 図 1 G 】

### 配列番号7 (SMOのa-a位置408での突然変異)

Met Ala Ala Ala Arg Pro Ala Arg Gly Pro Glu Leu Pro Leu Leu Gly Leu Leu Leu  
Leu Leu Leu Gly Asp Pro Gly Arg Gly Ala Asp Ser Ser Gly Asn Ala Thr Gly Pro Gly  
Leu Arg Ser Ala Gly Gly Ser Ala Arg Arg Ser Ala Val Thr Gly Pro Pro Pro Leu  
Ser His Cys Gly Arg Ala Ala Pro Cys Glu Pro Leu Arg Tyr Asn Val Cys Leu Gly Ser  
Val Leu Pro Tyr Gly Ala Thr Ser Thr Leu Leu Ala Gly Asp Ser Asp Ser His Glu Glu Ala  
His Leu Pro Lys Val Leu Trip Ser Gly Leu Arg Asn Ala Pro Arg Cys Trp Ala Val He Glu  
Pro Leu Leu Cys Ala Val Tyr Met Pro Lys Cys Glu Asn Asp Arg Val Glu Leu Pro Ser  
Arg Thr Leu Cys Glu Ala Thr Arg Gly Pro Cys Ala He Val Glu Arg Gly Arg Trp Pro  
Asp Phe Leu Arg Cys Thr Pro Asp Arg Phe Pro Glu Cys Thr Asp Glu Val Glu Asn  
Le Lys Phe Asn Ser Ser Gly Glu Cys Glu Val Pro Leu Val Arg Thr Asp Pro Lys Ser  
Trp Tyr Glu Asp Val Glu Gly Cys Glu Ile Glu Cys Glu Asp Pro Leu Phe Thr Glu Ala  
Glu His Ong Asp Met His Ser Tyr Ile Ala Phe Gly Ala Val Thr Glu Leu Cys Thr Leu  
Phe Thr Leu Ala Thr Phe Val Ala Asp Trp Arg Asn Ser Asn Arg Tyr Pro Ala Val He Leu  
Phe Tyr Val Asn Ala Cys Phe Val Phe Val Gly Ser Ile Gly Trip Leu Ala Glu Phe Met Asp Leu  
Ala Arg Arg Glu Ile Val Cys Arg Ala Asp Oly Thr Met Arg Leu Gly Glu Pro Thr Ser  
Asn Glu Thr Leu Ser Cys Val Ile Ile Phe Val Ile Val Tyr Tyr Ala Leu Met Ala Gly Val  
Val Trip Phe Val Val Leu Thr Tyr Ala Trp His Thr Ser Phe Lys Ala Leu Gly Thr Tyr  
Phe Pro Leu Ser Gly Lys Thr Ser Tvr His Leu His Leu Thr Trip Ser Leu Pro Phe Val Leu  
Thr Val Ala He Leu Ala Val Ala Glu Val Asp Gly Asp Set Val Set Gly Ile Cys Phe Val  
Gly Tyr Lys Asn Tyr Arg Tyr Arg Ala Gly Phe Val Leu Ala Pro Xaa Gly Leu Val Leu  
Leu Val Gly Gly Phe Leu Ile Arg Gly Val Met Thr Leu Phe Ser His Lys Ser Asn His  
Pro Gly Leu Leu Ser Glu Lys Ala Ala Ser Lys Ile Asn Glu Thr Met Leu Arg Leu Gly Ile  
Phe Gly Phe Leu Ala Phe Gly Phe Val Leu Ile Thr Phe Ser Cys His Phe Tyr Asp Phe Phe  
Asn Glu Ala Glu Trip Glu Arg Ser Phe Arg Asp Tyr Val Leu Cys Glu Ala Asn Val Th  
Ile Gly Leu Pro Thr Lys Glu Pro Ile Pro Asp Cys Glu Ile Lys Asn Arg Pro Ser Leu Leu  
Val Gly Lys He Asn Leu Phe Asa Met Phe Gly Thr Gly Ile Ala Met Ser Thr Trip Val Trip  
Thr Lys Ala Thr Leu Leu Ile Trip Arg Arg Thr Trip Cys Arg Leu The Oly Gln Asp Ser  
Asp Asp Glu Pro Lys Arg Ile Lys Lys Ser Lys Met He Ile Ala Lys Ala Phe Ser Lys Arg His Glu  
Leu Leu Glu Asn Pro Gly Glu Leu Ser Phe Ser Met His Thr Val Ser His Asp Gly Pro  
Val Ala Gly Leu Ala Phe Asp Leu Asn Glu Pro Ser Ala Asp Val Set Ser Ala Trip Ala Glu  
His Val Thr Lys Met Val Ala Arg Arg Gly Ala Ile Leu Pro Glu Asp Ile Ser Val Thr Pro  
Val Ala Thr Pro Val Pro Pro Glu Glu Glu Glu Asn Leu Trip Leu Val Glu Ala Glu His Ser  
Pro Glu Leu Glu Lys Arg Leu Gly Arg Lys Lys Arg Arg Lys Arg Lys Lys Gly Lys Val Glu  
Cys Pro Leu Ala Pro Pro Pro Glu Leu His Pro Pro Ala Pro Ala Pro Ser Set Thr Ile Pro Arg  
Leu Pro Glu Leu Pro Arg Gly Lys Cys Leu Val Ala Ala Gly Ile Trip Glu Ala Gly Agy  
Ser Cys Arg Gly Ile Trip Thr Leu Val Ser Asn Pro Phe Cys Pro Phe Cys Pro Ser Pro Pro  
Gln Asp Pro Phe Leu Pro Ser Ala Pro Ala Pro Val Ala Trip Ala His Gly Arg Arg Glu Gly  
Leu Gly Pro Ile His Ser Arg Thr Asn Leu Met Asp Thr Glu Leu Met Asp Ala Asp Ser  
Asp Phe

【 図 1 H 】

配列番号8 (SMOのa a 位置4 6 9での突然変異)

Met Ala Ala Ala Arg Pro Ala Arg Gly Pro Lys Leu Pro Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Asp Pro Gly Arg Gly Ala Asl Ser Ser Gly Asn Ala Thr Gly Pro Gly Pro Arg Ser Ala Gly Ser Set Ala Ser Ala Val Thr Gly Pro Pro Pro Leu Ser His Cys Gly Arg Ala Ala Pro Cys Gly Pro Leu Arg Tyr Asn Val Cys Leu Gly Ser Val Leu Pro Tyr Gly Val Thr Ser Set Thr Leu Leu Ala Gly Ser Set Ser Set Ser Gly Glu Ala His Gly Lys Leu Val Lys Trp Set Gly Leu Arg Asn Ala Pro Arg Cys Trp Ala Val Ile Gin Pro Leu Leu Cys Ala Val Tyr Met Pro Lys Cys Gly Asn Asp Arg Val Glu Leu Pro Ser Arg Thr Leu Cys Gin Ala Thr Arg Gly Pro Cys Ala Ile Val Glu Arg Glu Arg Gly Trp Pro Asp Phe Leu Cys Gly Thr Pro Asp Arg Phe Pro Glu Gly Cys Thr Asn Glu Val Glu Asn Ile Lys Phe Asn Ser Ser Gly Gin Cys Glu Val Pro Leu Val Arg Thr Asp Asp Pro Lys Ser Trp Tyr Glu Asp Val Glu Gly Cys Gly Ile Glu Cys Gly Asn Pro Leu Phe Thr Glu Ala Glu His Glu Asp Met His Ser Tyr Ile Ala Alp Phe Gly Ala Val Thr Gly Cys Thr Leu Phe Thr Leu Ala Thr Phe Val Ala Asp Trp Arg Asn Ser Asn Arg Arg Tyr Pro Ala Val Ile Leu Phe Tyr Val Asn Ala Cys Phe Phe Val Gly Ser Ile Gly Trp Leu Ala Glu Phe Met Asp Gly Asa Arg Glu Ile Val Cys Arg Ala Asp Gly Thr Met Asp Leu Gly Glu Pro Ths Asn Glu Phe Thr Leu Ser Cys Val Ile Phe Val Ile Val Tyr Ala Leu Met Asa Gly Val Val Val Tp Phe Val Val Leu Thr Tyr Ala Trp His Thr Ser Phe Lys Ala Leu Gly Thr Thr Tyr Glu Pro Leu Ser Gly Lys Thir Ser Tyr Phe His Leu Thr Trp Set Leu Pro Phe Val Leu The Val Ala Ile Leu Ala Val Ala Glu Val Asp Gly Asp Ser Val Ser Gly Ile Cys Phe Val Gly Tyr Lys Asn Tyr Arg Tyr Ala Gly Phe Val Leu Ala Pro His Glu Leu Val Ile Leu Val Gly Gly Tyr Phe Leu Ile Arg Gly Val Met Thr Leu Phe Ser Ile Lys Ser Asn His Pro Gly Leu Leu Ser Gly Ile Ala Asa Set Lys Ile Asn Glu Thr Met Leu Arg Leu Gly Ile Phe Gly Phe Leu Asp Phe Gly Phe Val Leu Ile Thr Phe Ser Xaa His Phe Tyr Asp Phe Asn Asn Gin Ala Glu Trp Gly Arg Ser Phe Arg Asp Tyr Val Leu Cys Gin Ala Asn Val Thir Ile Gly Leu Pro Thr Lys Gin Pro Ile Pro Asp Gly Cys Glu Ile Lys Asn Arg Pro Ser Leu Leu Val Vai Glu Ile Asn Leu Phe Ala Met Phe Gly Thr Gly Ile Ala Met Ser Thir Trp Val Tp Thr Lys Ala Thr Leu Leu Ile Trp Arg Arg Thr Trp Cys Arg Leu Thr Gly Gin Ser Asp Asp Gly Pro Lys Arg Ile Lys Ser Lys Met Ile Ala Lys Phe Ser Lys Arg His Glu Leu Leu Gin Asn Pro Gly Gin Glu Leu Ser Phe Ser Met His Thir Val Ser His Asp Gly Pro Val Ala Gly Leu Leu Phe Asp Leu Asn Gly Pro Ser Ala Asp Val Ser Set Ala Trp Ala Glu His Val Thir Lys Met Val Ala Arg Arg Gly Ala Ile Leu Pro Glu Asp Ile Set Val Thir Pro Val Asp Thir Pro Val Pro Glu Gly Glu Ala Asn Leu Trp Leu Val Gly Ala Glu Ile Ser Pro Glu Leu Gin Lys Arg Leu Gly Arg Lys Lys Lys Lys Arg Arg Lys Arg Lys Lys Glu Val Cys Pro Leu Ala Pro Pro Pro Glu Leu His Pro Pro Ala Pro Set Thir Pro Arg Leu Pro Glu Leu Gin Pro Arg Gin Lys Cys Leu Val Ala Ala Cys Ala Trp Gly Ala Glv Asp Ser Cys Arg Gin Glv Ala Trp Thir Leu Val Ser Asn Pro Phe Cys Pro Glu Pro Ser Pro Phe Pro Glu Asp Phe Leu Ser Asp Ala Pro Ala Val Ala Trp Ala His Glv Arg Arg Glu Leu Gly Pro Ile His Ser Arg Thir Asn Leu Met Asp Thir Glu Leu Met Asp Ala Asp Ser Asp Phe

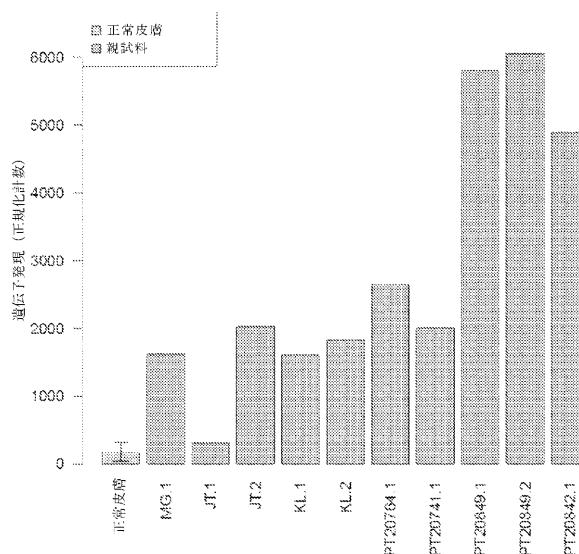
【 図 1 】

配列番号9 (SMOのa-a位置533での突然変異)

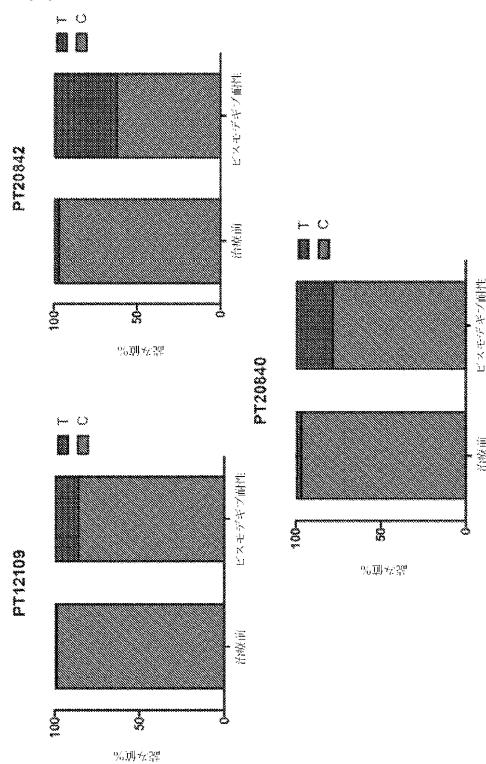
Met Ala Ala Ala Arg Pro Ala Arg Gly Pro Glu Leu Pro Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu  
Leu Leu Leu Gly Asp Pro Gly Arg Gly Ala Ala Ser Ser Gly Asn Ala Thr Gly Pro Gly  
Pro Arg Ser Ala Gly Ser Ala Arg Arg Ser Ala Val Thr Gly Pro Pro Pro Pro Leu  
Ser His Cys Gly Arg Ala Ala Pro Cys Glu Pro Leu Arg Tyr Asn Val Cys Leu Gly Ser  
Val Leu Pro Tyr Val Leu Thr Ser Leu Leu Ala Gly Asp Ser Asp Ser Gln Glu Ala  
His Gly Leu Val Leu Thr Ser Gly Leu Arg Asn Ala Pro Arg Cys Trp Ala Val Glu Ala  
Pro Leu Leu Cys Ala Val Tyr Met Pro Lys Cys Glu Asn Asp Arg Val Glu Leu Pro Ser  
Arg Thr Leu Cys Glu Ala Thr Arg Gly Pro Cys Ala Ile Val Glu Arg Glu Arg Gly Trp Pro  
Asp Pha Leu Arg Cys Thr Pro Asp Arg Pro Pha Glu Gly Cys Thr Asn Glu Val Glu Ala  
Ile Lys Phe Asn Ser Ser Gly Glu Cys Glu Val Pro Leu Val Arg Thr Asp Asn Pro Lys Ser  
Trp Tyr Glu Asp Val Glu Gly Cys Gly Ile Cys Glu Asn Pro Leu Pro Phe Thr Glu Ser  
His Gly Asp Met His Ser Tyr Ile Ala Glu Phe Gly Ala Val Thr Gly Leu Cys Thr Leu  
Phe Thr Leu Ala Thr Phe Val Ala Asp Trp Arg Asn Ser Asn Arg Tyr Pro Ala Val Ile Leu  
Phe Tyr Val Asn Ala Cys Phe Phe Val Gly Ser Ile Gly Trp Leu Ala Glu Phe Met Asp Gly  
Ala Arg Arg Glu Ile Val Cys Arg Ala Asp Gly Thr Met Arg Leu Gly Pro The Ser  
Asn Glu Thr Leu Ser Cys Val Ile Ile Phe Val Le Val Tyr Tyr Ala Leu Met Ala Glu Val  
Val Val Pro Phe Val Leu Leu Thr Tyr Ala Trp His Thr Ser Phe Lvs Ala Leu Gly Thr Tyr  
Gln Pro Leu Ser Gly Lys Tyr Ser Phe His Leu Leu Ile Thr Trp Ser Leu Pro Phe Val Leu  
Thr Val Ala Leu Ala Val Ala Glu Val Asp Gly Asp Ser Val Ser Gly Ile Cys Phe Val Gly  
Gly Tyr Lys Asn Tyr Arg Tyr Arg Ala Gly Phe Val Leu Ala Pro Ile Gly Leu Val Leu Val  
Val Gly Gly Ile Phe Leu Ile Arg Gly Val Met Thr Leu Phe Ser Ile Lys Ser Asn His Pro  
Gly Leu Leu Ser Glu Lys Ala Ala Ser Lys Ile Phe Asn Glu Thr Met Leu Arg Leu Gly Ile Phe  
Gly Phe Leu Ala Phe Gly Val Phe Val Leu Ile Thr Phe Ser Gly His Phe Tyr Asp Phe Asn His  
Gln Ala Glu Trp Gly Arg Ser Phe Arg Asp Tyr Val Leu Cys Gln Ala His Val Thr Ile Gly  
Leu Pro Thr Lys Gly Pro Ile Pro Asp Cys Glu Ile Lys Asn Arg Pro Ser Leu Leu Val Glu  
Lys He Asn Leu Phe Ala Met Phe Thr Gly Ile Ala Met Xaa Thr Tha Tip Val Tip Thr His  
Ala Thr Leu Leu Ile Trp Arg Arg Tha Trp Cys Arg Leu Thr Gly Gln Ser Asp Asp Gly  
Pro Lys Arg His Lys Lys Ser Lys Met Leu Ala Lys His Phe Ser His Lys Arg His Glu Leu  
Gln Asn Pro Gly Gln Lys Leu Ser Lys Phe Ser Met His Tha Val Ser His Asp Gly His Pro Val  
Ala Gly Leu Ala Phe Asp Leu Asn Glu Pro Ser Ala Asp Val Ser Ser Ala Trp Ala Glu His Val  
Thr Lys Met Val Ala Arg Arg Gly Ala Ile Leu Pro Glu Asp Ser His Val Thr Val Pro Val  
Ala Gly Pro Val Pro Glu Gly Cys Glu Ala Asn Leu Leu Ile Val Glu Ala Glu Ile Ser Pro Glu  
Leu Glu Lys Arg Leu Gly Arg Lys Lys Arg Arg Lys Arg Lys Lys Arg Lys Glu Val Cys Pro  
Leu Ala Pro Pro Pro Glu Leu His Pro Pro Pro Pro Pro Ser The Ile Pro Arg Leu Pro  
Gly Leu Pro Arg Gly Lys Leu Val Ile Ala Gly Ile Phe Ser Gly Ile Gly Asp Ser Cys Cys  
Arg Gly Gly Ala Trp Thr Leu Val Ser Asn Pro Phe Cys Pro Glu Pro Ser Pro Phe Pro Glu Asp  
Pro Phe Leu Pro Ser Ala Pro Ala Pro Val Val Asp Ala His Gly Arg Arg Gly Glu Leu Gly  
Pro His His Ser Arg Thr Asn Leu Met Asp Thr Glu Leu Met Asp Ala Ser Asp Phe

【 図 2 】

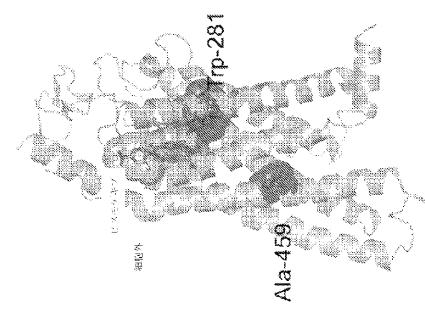
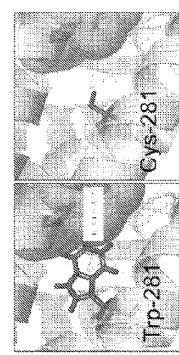
G.I.I.I 發現



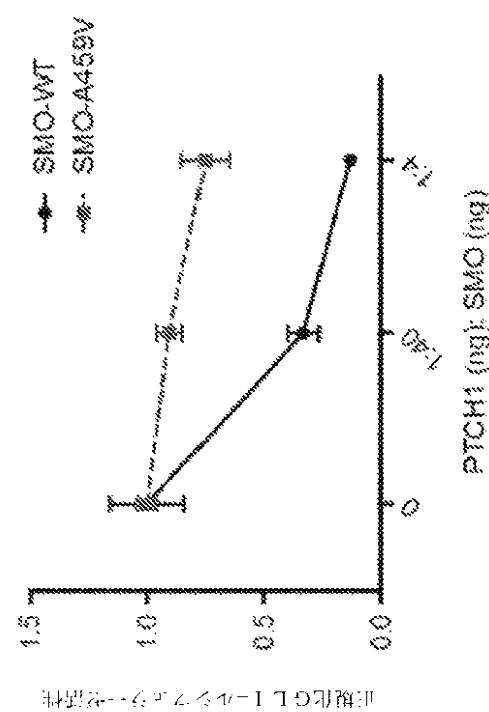
【図3】



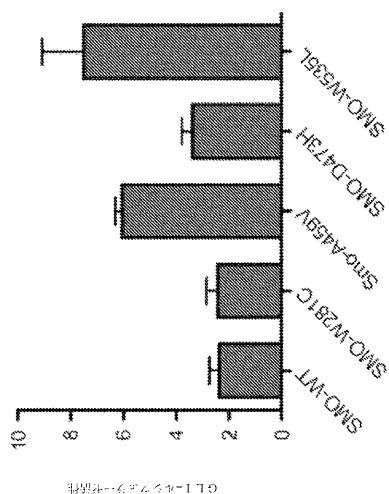
【図4】



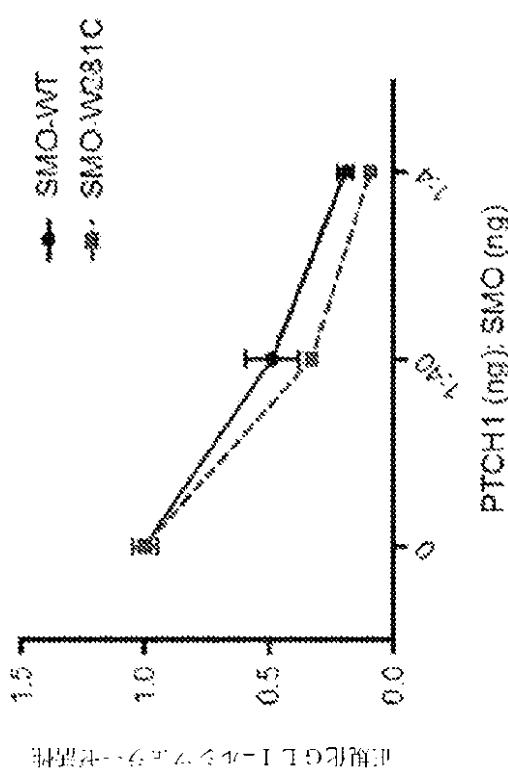
【図5 A】



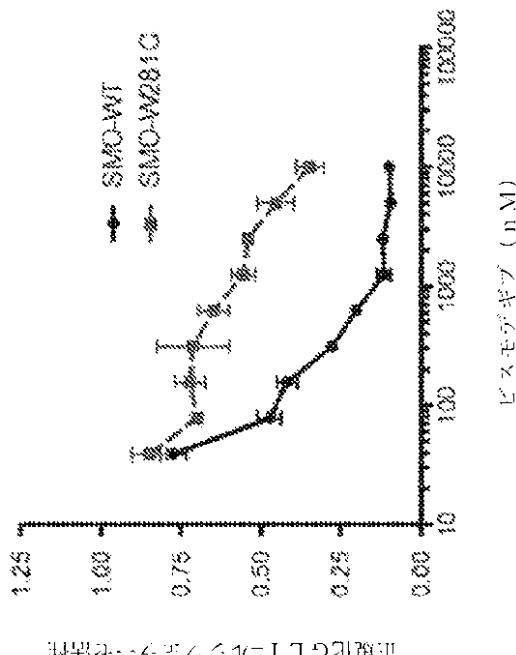
【図 5 C】



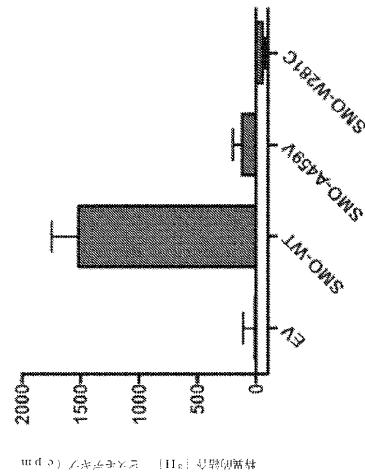
【図 5 D】



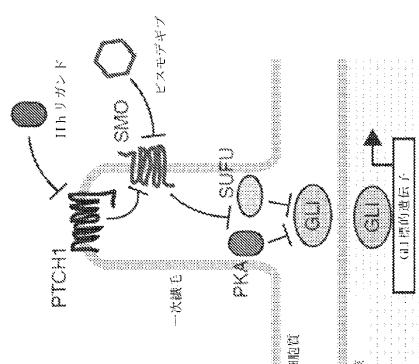
【図 5 E】



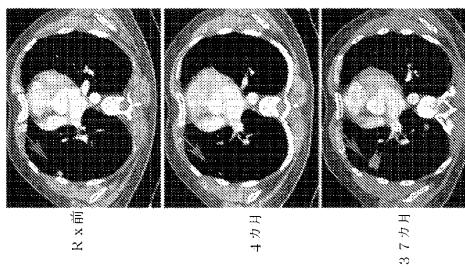
【図 5 F】



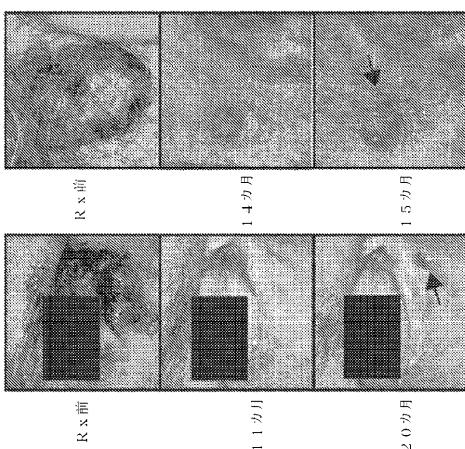
【図 6 A】



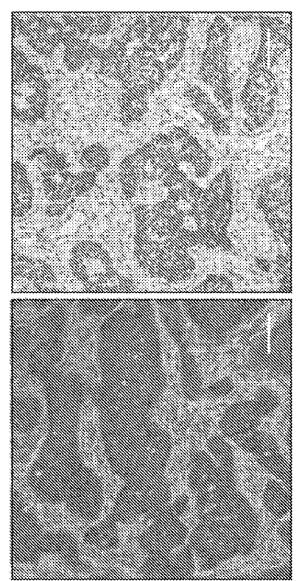
【図 6 B】



【図 6 C】

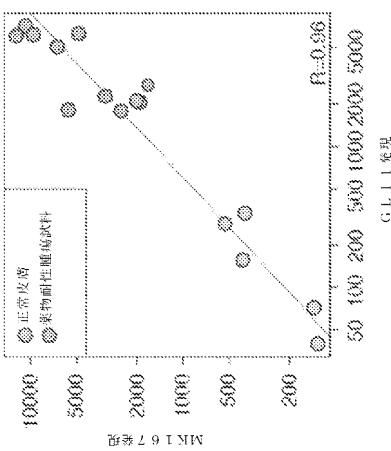


【図 6 D】

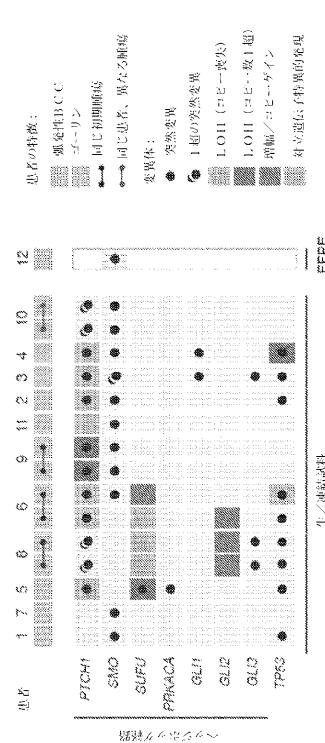


再成長

【図 6 E】

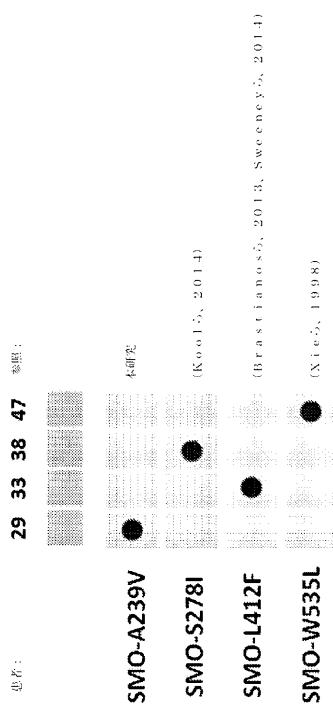


【図 6 F】

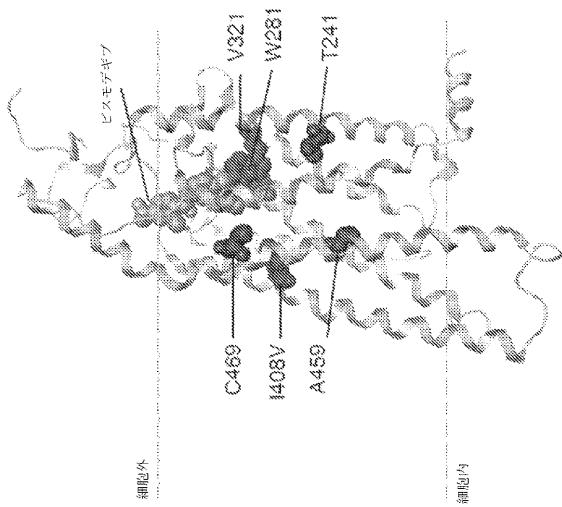


新規変異

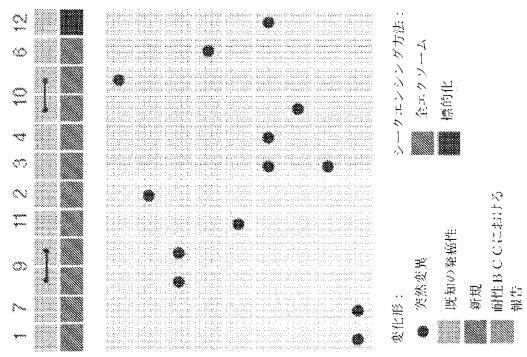
【圖 7】



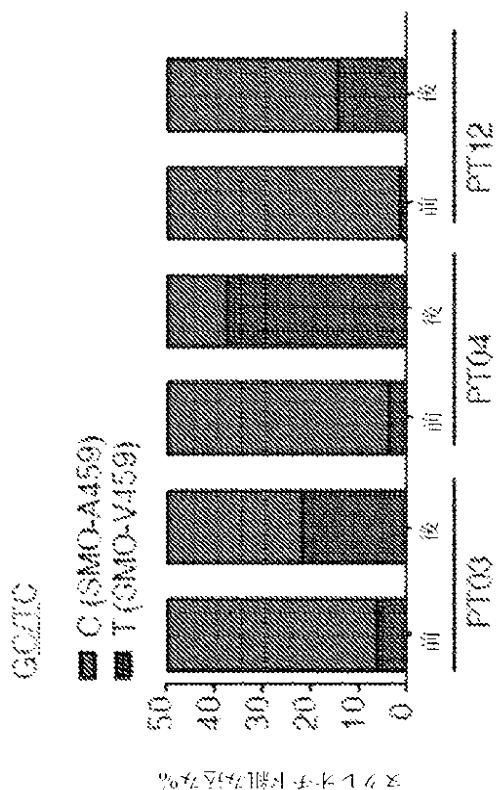
【 図 8 B 】



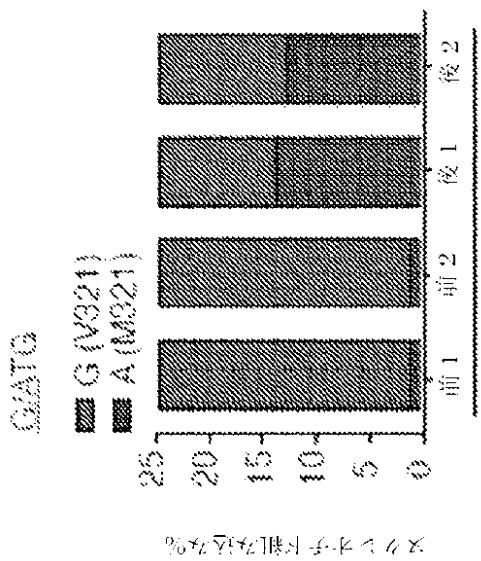
【 図 8 A 】



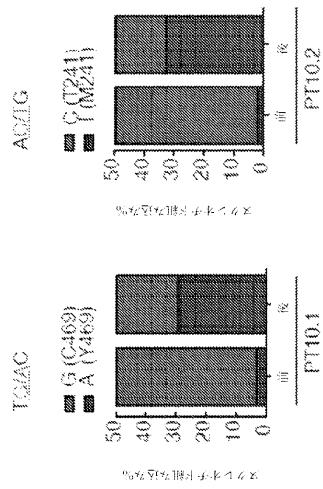
【図8C】



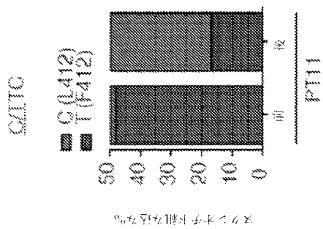
【図 8 D】



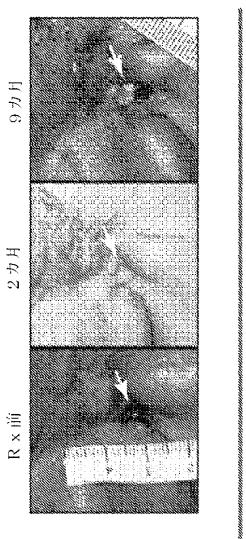
【図 8 E】



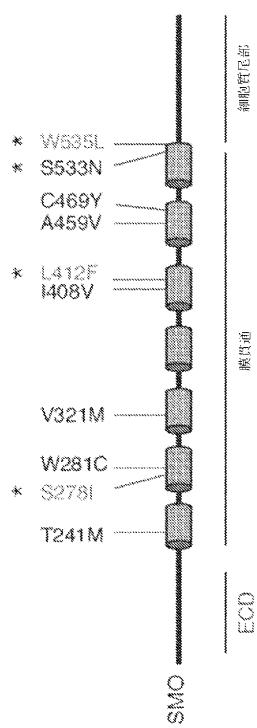
【図 8 F】



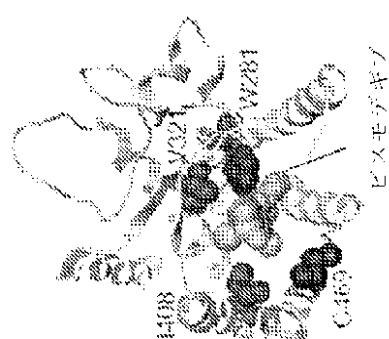
【図 8 G】



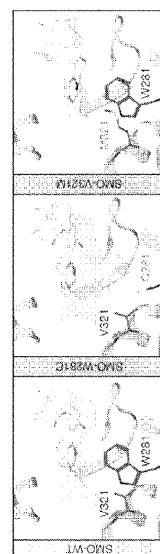
【図 9】



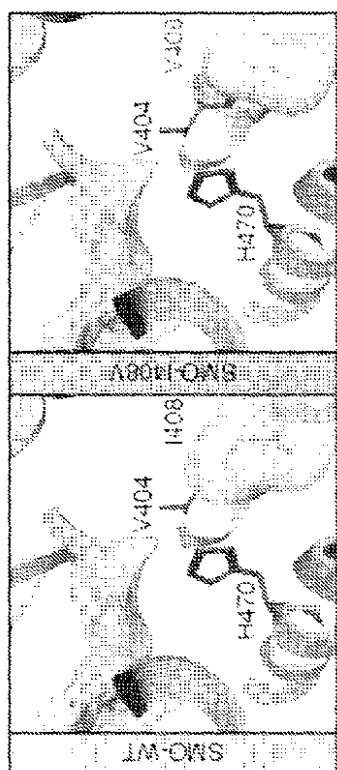
【図 10 A】



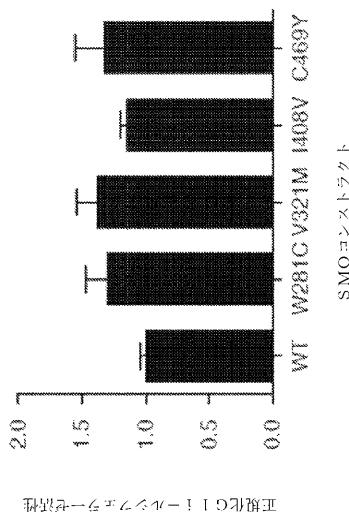
【図 10 B】



【図 10 C】

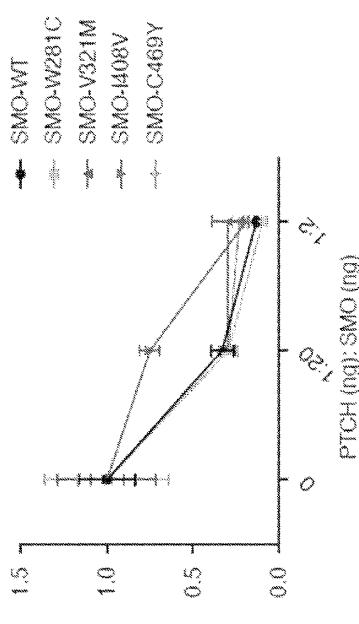


【図 11 A】



SMO-ε-ストラクト

【図 1 1 B】

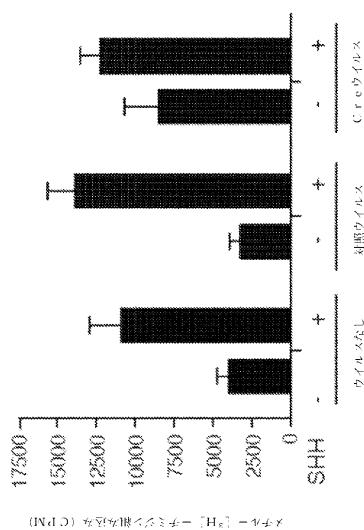


正規化O.D. = ハウスキュー/各試験

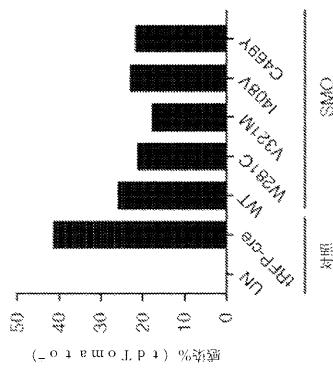
【図 1 1 C】

細胞表面活性質有する311E K 2 9 3細胞%	
空ベクター	0.321
SMO-WT	58.8
SMO-W281C	52.8
SMO-I408V	46.3

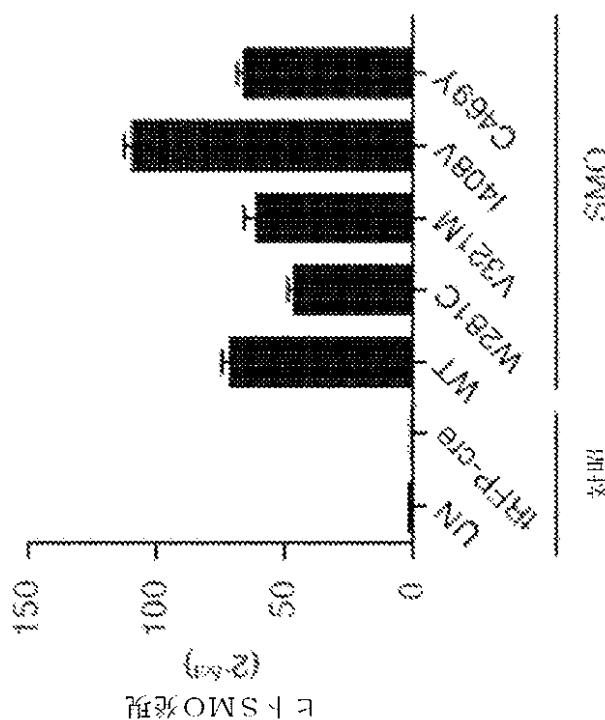
【図 1 1 D】

X:  $[H_3^{3H}] = 4.4 \times 10^{-12} \text{ Ci/mmol}$  (CPN)

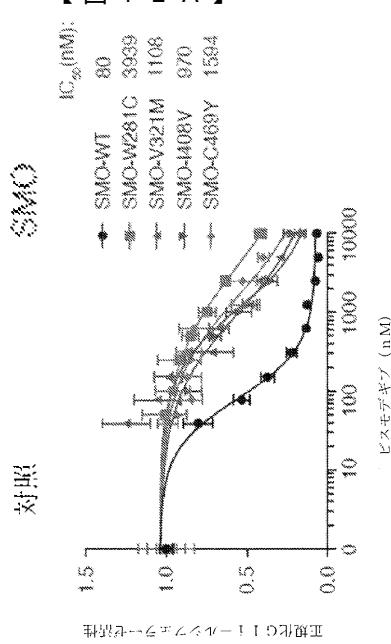
【図 1 1 E】



【図 1 1 F】

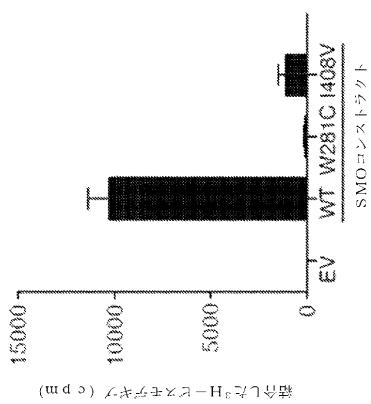


【図 1 2 A】

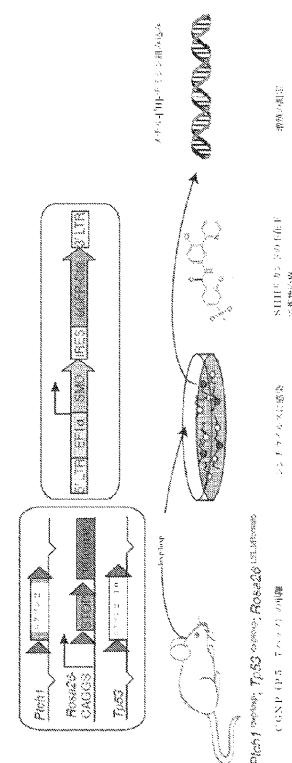


正規化 G 1 - M で S-200 までの増殖性

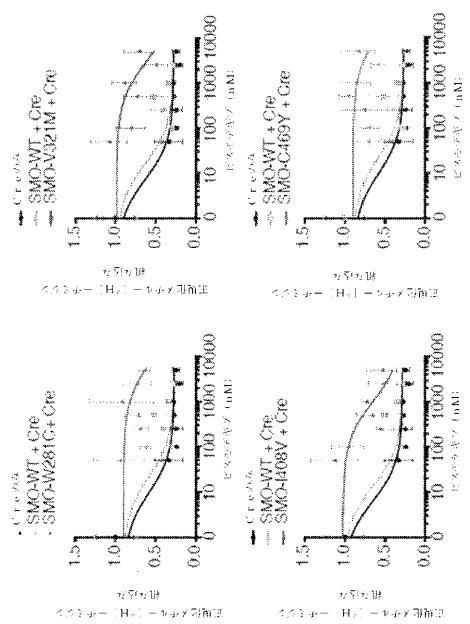
【図 1 2 B】



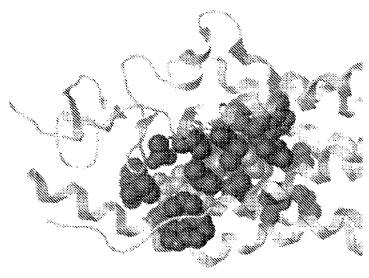
【図 1 2 C】



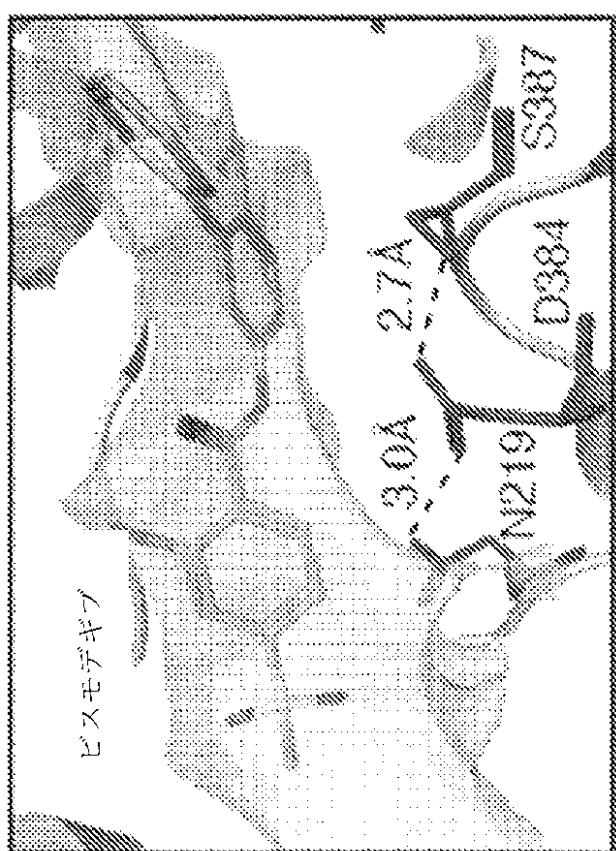
【図 12 D】



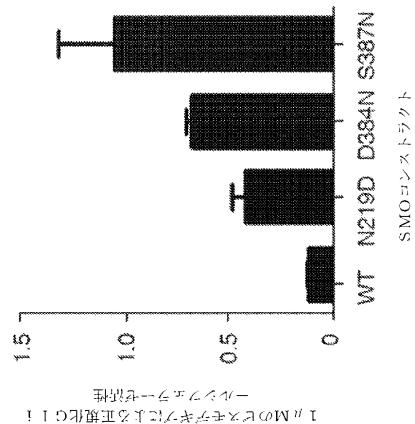
【図 13 A】



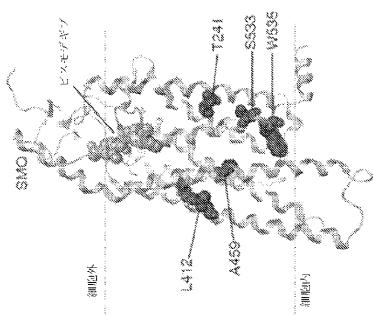
【図 13 B】



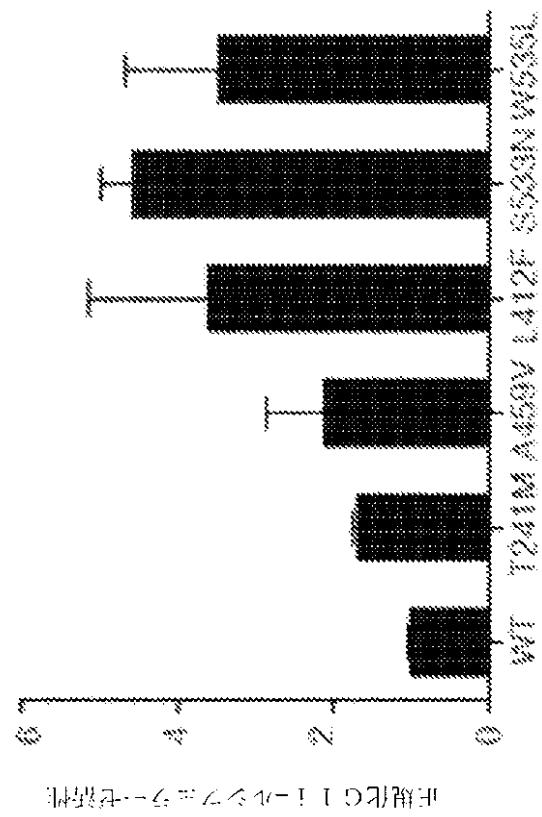
【図 13 C】



【図 14 A】

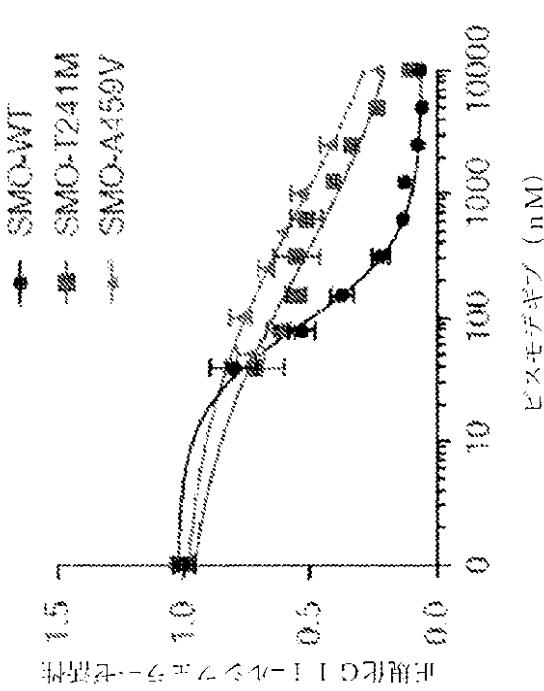


【図 14 B】



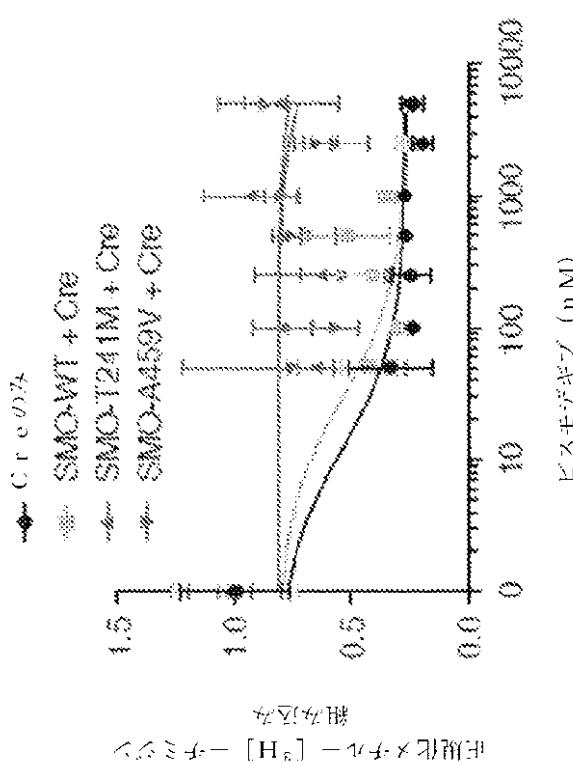
ECL検出器による電気泳動

【図 14 C】



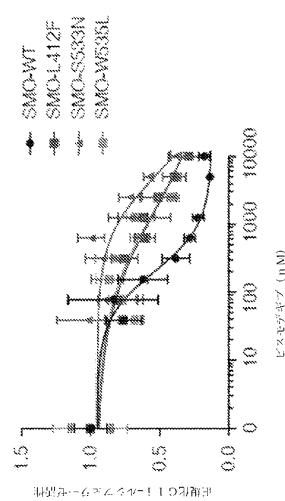
SMO活性ストラクト

【図 14 D】

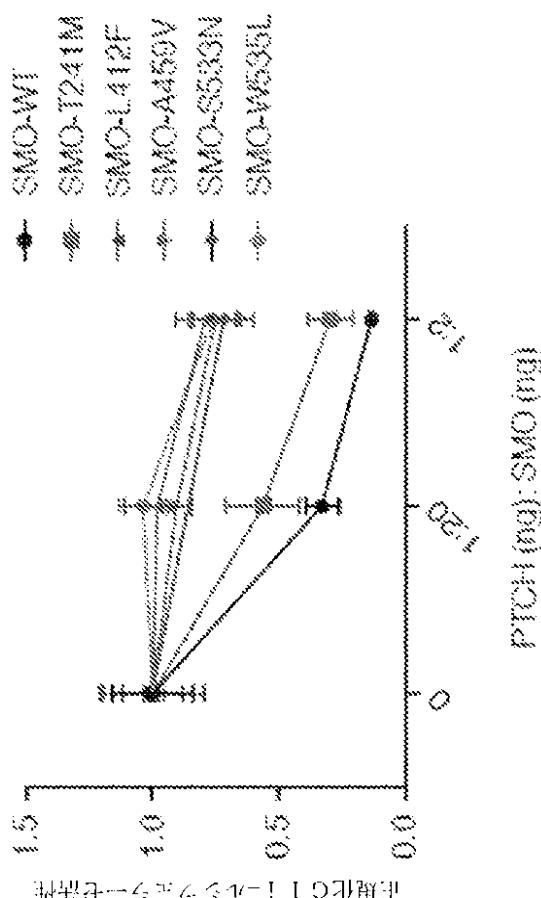


ECL検出器による電気泳動

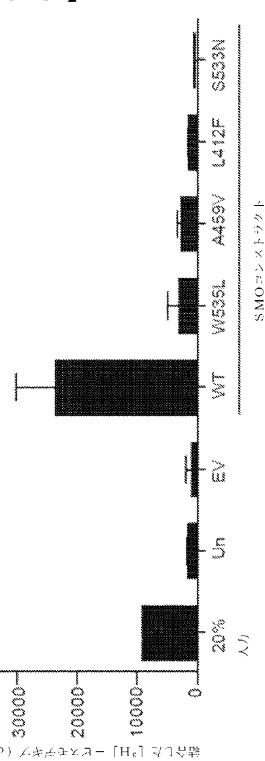
【図 15 A】



【図 15 B】



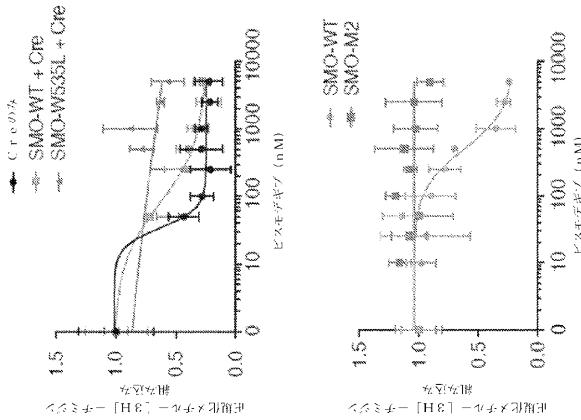
【図 15 C】



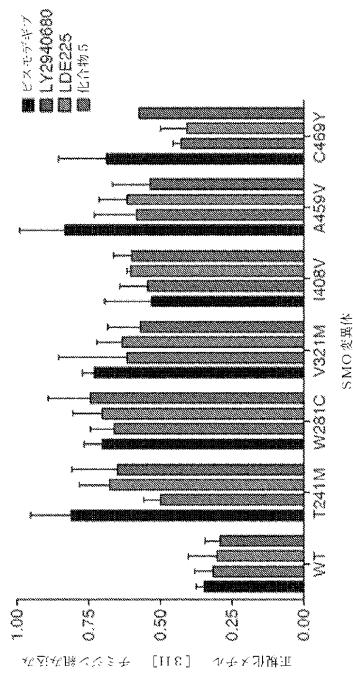
【図 15 D】

	細胞表面発現を有する SMO 細胞 %
空ベクター	0.321
SMO-WT	50.0
SMO-A459V	60.3
SMO-S533N	61.7
SMO-W535L	54.1

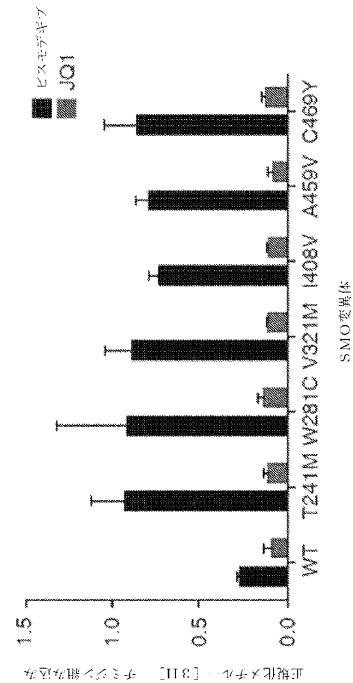
【図 15 E】



【図 16 A】



【図 16 B】



【配列表】

2018512597000001.xml

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2016/016614
---

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/705 C12Q1/68 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, EMBL, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>TJINTA BRINKHUIZEN ET AL: "Acquired resistance to the Hedgehog pathway inhibitor vismodegib due to smoothened mutations in treatment of locally advanced basal cell carcinoma", JOURNAL OF THE AMERICAN ACADEMY OF DERMATOLOGY., vol. 71, no. 5, 1 November 2014 (2014-11-01), pages 1005-1008, XP055287739, US ISSN: 0190-9622, DOI: 10.1016/j.jaad.2014.08.001 cited in the application the whole document</p> <p>-----</p> <p>-/-</p>	1-77
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
** later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art '&' document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
13 July 2016	25/07/2016	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.O. 5818 Patentpoort 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Kools, Patrick	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2016/016614

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  -----	Relevant to claim No.
A	PRICL SABRINA ET AL: "Smoothened (SMO) receptor mutations dictate resistance to vismodegib in basal cell carcinoma", MOLECULAR ONCOLOGY, vol. 9, no. 2, 26 September 2014 (2014-09-26), pages 389-397, XP029190456, ISSN: 1574-7891, DOI: 10.1016/J.MOLONC.2014.09.003 cited in the application the whole document -----	1-77
A	JAMES KIM ET AL: "Itraconazole and Arsenic Trioxide Inhibit Hedgehog Pathway Activation and Tumor Growth Associated with Acquired Resistance to Smoothened Antagonists", CANCER CELL, vol. 23, no. 1, 1 January 2013 (2013-01-01), pages 23-34, XP055287900, US ISSN: 1535-6108, DOI: 10.1016/j.ccr.2012.11.017 Whole document, especially figure 1. -----	1-77
A	SIGRID NACHTERGAELE ET AL: "Structure and function of the Smoothened extracellular domain in vertebrate Hedgehog signaling", ELIFE, vol. 127, 29 October 2013 (2013-10-29), page 17894, XP055288002, DOI: 10.1021/ja056151p the whole document -----	1-77
A	HAIYAN TAO ET AL: "Small Molecule Antagonists in Distinct Binding Modes Inhibit Drug-Resistant Mutant of Smoothened", CHEMISTRY AND BIOLOGY., vol. 18, no. 4, 1 April 2011 (2011-04-01), pages 432-437, XP055288017, GB ISSN: 1074-5521, DOI: 10.1016/j.chembiol.2011.01.018 the whole document ----- -----	1-77 -/-

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2016/016614

## C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ISHII TSUYOSHI ET AL: "Inhibition mechanism exploration of investigational drug TAK-441 as inhibitor against Vismodegib-resistant Smoothened mutant", EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY, vol. 723, 28 November 2013 (2013-11-28), pages 305-313, XP028607967, ISSN: 0014-2999, DOI: 10.1016/J.EJPHAR.2013.11.014 abstract -----	1-77
A, P	ATWOOD SCOTT X ET AL: "Smoothened Variants Explain the Majority of Drug Resistance in Basal Cell Carcinoma", CANCER CELL, vol. 27, no. 3, 9 March 2015 (2015-03-09), pages 342-353, XP029144928, ISSN: 1535-6108, DOI: 10.1016/J.CCCELL.2015.02.002 the whole document -----	1-77

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/US2016/016614

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
  
  
  
2.  Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
  
  
  
3.  Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
  
  
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ US2016/ 016614

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-77

SMO mutants and their uses.

1.1. claims: 1, 2, 5-7, 21-23, 37-40, 45-48, 60-63, 68-72(completely); 11-20, 27-32, 53-59(partially)

Methods for screening for compositions that inhibit signaling of a mutant SMO protein having a mutation on position 241. Isolated nucleic acid encoding the mutant SMO. Vector comprising said nucleic acid. Host cell comprising the vector. Host cell capable of expressing the vector. Method of identifying a hedgehog pathway inhibitor using said cell. Method of identifying at least one SMO mutation using a hybridization probe capable of identifying a mutation at amino acid position 241. Method for identifying a tumor in a human having a mutation at position 241 of the SMO protein. Method of inhibiting proliferation cell growth comprising administrating a bromodomain inhibitor to a cell wherein the cell expresses the 241 mutant. Nucleic acid specifically hybridizing to a nucleic acid encoding the 241 mutated SMO protein. Antibody specific for the 241 SMO mutant.

1.2. claims: 3, 4, 8-10, 24-26, 41-44, 49-52, 64-67, 73-77(completely); 11-20, 27-32, 53-59(partially)

As for subject 2 now the mutation is at position 469.

1.3. claims: 33-36

Method of detecting a mutated SMO gene by amplifying the carboxy terminus encoding nucleic acid of the first extracellular loop of the SMO protein.

---

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02
C 1 2 Q	1/68	(2018.01)	C 1 2 Q	1/68
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
G 0 1 N	33/15	(2006.01)	G 0 1 N	33/15
G 0 1 N	33/574	(2006.01)	G 0 1 N	33/574
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53
C 1 2 Q	1/66	(2006.01)	G 0 1 N	33/53
			C 1 2 Q	1/66

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(71)出願人 514316226

ユニヴェルシテ パリ ディドロ - パリ 7  
 UNIVERSITE PARIS DIDEROT - PARIS 7  
 フランス、エフ-75205 パリ セデックス 13、リュ トマ マン、5  
 5, rue Thomas Mann, F-75205 Paris Cedex 13,  
 France

(74)代理人 110000280

特許業務法人サンクレスト国際特許事務所

(72)発明者 ド ソバージュ フレデリック ジェイ.

アメリカ合衆国 94080 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ ディーエヌエーウェイ 1

(72)発明者 ヨーチ ロバート エル.

アメリカ合衆国 94080 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ ディーエヌエーウェイ 1

(72)発明者 ダイクラーフ ヘリット イエー.ペー.

アメリカ合衆国 94080 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ ディーエヌエーウェイ 1

(72)発明者 シャーペ ヘイリー

アメリカ合衆国 94080 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ ディーエヌエーウェイ 1

(72)発明者 バセー - セガン ニコル

フランス共和国 75017 パリ アヴニュ ド ヴィリエール 71

Fターム(参考) 2G045 AA24 AA26 AA40 CB01 CB02 DA12 DA13 DA14 DA36 FA40

FB07 FB20

4B063 QA01 QA17 QA18 QA19 QQ13 QQ22 QQ79 QR08 QR33 QR42

QR56 QR58 QR59 QR62 QS05 QS16 QS25 QS28 QS33 QS34  
QS36 QX02  
4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AA90Y AB01 AC14 BA01 CA24 CA44  
4C084 AA17 MA16 MA66 NA14 ZB262 ZC202  
4H045 AA10 AA11 AA30 BA70 BA71 BA72 CA41 DA50 DA76 EA20  
FA74